

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 3 月 1 日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/14522 A1

(51) 国際特許分類: C12N 1/19, C12P 21/02 // (C12N 1/19, C12R 1:865) (C12P 21/02, C12R 1:865)

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05474

(22) 国際出願日: 2000 年 8 月 16 日 (16.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/233215 1999 年 8 月 19 日 (19.08.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 麒麟  
麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)  
[JP/JP]; 〒104-8288 東京都中央区新川二丁目10番1号  
Tokyo (JP). 工業技術院長が代表する日本国 (JAPAN  
as represented by SECRETARY OF AGENCY OF IN-  
DUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP];  
〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo  
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 千葉靖典  
(CHIBA, Yasunori) [JP/JP]. 貝沼真美 (KAINUMA,

Mami) [JP/JP]. 竹内 誠 (TAKEUCHI, Makoto)  
[JP/JP]. 川島永子 (KAWASHIMA, Eiko) [JP/JP]. 吉  
田 聡 (YOSHIDA, Satoshi) [JP/JP]. 山野重幸 (YA-  
MANO, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒236-0004 神奈川県横浜  
市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研  
究所内 Kanagawa (JP). 地神芳文 (JIGAMI, Yoshifumi)  
[JP/JP]; 〒300-1233 茨城県牛久市栄町6-255 Ibaraki  
(JP). 石井智子 (ISHII, Tomoko) [JP/JP]; 〒305-0042 茨  
城県つくば市下広岡1055-588 Ibaraki (JP). 新聞陽一  
(SHIMMA, Yoh-ichi) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県つく  
ば市吾妻1-408-301 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.) ; 〒  
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5  
森ビル3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL YEAST VARIANTS AND PROCESS FOR PRODUCING GLYCOPROTEIN CONTAINING MAMMALIAN  
TYPE SUGAR CHAIN

(54) 発明の名称: 新規な酵母変異株および哺乳類型糖鎖を含有する糖タンパク質の製造法

(57) Abstract: Novel yeast variants capable of producing a glycoprotein wherein a sugar chain having the same sugar chain structure  
as a sugar chain produced by mammalian cells is attached to an asparagine residue of a protein; and a process for producing the sugar  
chain and the glycoprotein by a sugar chain engineering technique with the use of these variants. By using the auxotrophic triplex or  
tetraplex variant newly bred, a neutral sugar chain identical with the high-mannose type produced by mammalian cells (human cells,  
etc.) or a glycoprotein having the same neutral sugar chain can be efficiently produced at a high purity. By transferring a mammalian  
type sugar chain biosynthesis-associated gene into such a variant, it is also possible to efficiently produce a mammalian sugar chain  
of high-mannose type, hybrid type, complex type, etc. or a protein having a mammalian type sugar chain.

[続葉有]



WO 01/14522 A1



---

(57) 要約:

哺乳類細胞の生産する糖鎖と同一の糖鎖構造をもつ糖鎖をタンパク質のアスパラギン残基に付加した糖タンパク質を生産することのできる新規な酵母変異株、ならびに該変異株を用いて糖鎖工学的手法により糖鎖および糖タンパク質を製造する方法を提供する。

本発明により新規に育種した栄養要求性三重変異株、栄養要求性四重変異株によれば、ヒトなど哺乳類細胞の生産するハイマンノース型と同一の中性糖鎖、あるいは同一の中性糖鎖を有する糖タンパク質を多量かつ純度よく生産することができる。また、当該変異株に哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を導入することにより、ハイマンノース型、ハイブリッド型、複合型等の哺乳類型糖鎖、あるいは哺乳類型糖鎖を有するタンパク質を効率的に生産することができる。

## 明 細 書

## 新規な酵母変異株および哺乳類型糖鎖を含有する糖タンパク質の製造法

## 技術分野

本発明は、哺乳類細胞の生産する糖鎖と同一の糖鎖構造を有する糖鎖をタンパク質のアスパラギン残基に付加した糖タンパク質生産能を有する新規な酵母変異株、ならびに該変異株を用いて糖鎖工学的手法により糖鎖および糖タンパク質を製造する方法に関する。

## 背景技術

天然界に存在するタンパク質には、アミノ酸のみからなる単純タンパク質と、糖鎖や脂質、リン酸などが結合した複合タンパク質の2種類があり、サイトカイン類に関してはそのほとんどが糖タンパク質であることが知られている。このうち、エリスロポエチン（EPO）や組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）などについては、その糖鎖を除くと本来の生物活性を示さなくなることが明らかにされてきた（木幡陽、蛋白質核酸酵素、36, 775-788 (1991)）。糖鎖が生物活性の発現に重要な役割を担っていることが予想されるが、糖鎖の構造と生物活性との相関が必ずしも明確でないため、タンパク質部分に付加する糖鎖の構造（糖の種類、結合位置、鎖長など）を自由自在に改変制御できる技術の開発が必要となる。

糖タンパク質の糖鎖には、大別して、Asn結合型、ムチン型、O-GlcNAc型、GPIアンカー型、プロテオグリカン型などがあり（竹内誠、グリコバイオロジーシリーズ5、グリコテクノロジー、木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、講談社サイエンティフィック、191-208 (1994)）、それぞれ固有の生合成経路を持ち、個別の生理機能を担っている。このうち、Asn結合型糖鎖の生合成経路については多くの知見があり、詳しく解析されている。

Asn結合型糖鎖の生合成は、N-アセチルグルコサミン、マンノース、およびグルコースからなる前駆体が脂質キャリアー中間体の上に合成され、まず小胞体

(ER) で糖タンパク質の特定の配列 (Asn-X-SerまたはThr) に転移される。次にプロセッシング (グルコース残基と特定のマンノース残基の切断) を受け、マンノース 8 残基と N-アセチルグルコサミン 2 残基からなる M8 ハイマンノース型糖鎖 ( $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ) が合成される。このハイマンノース型糖鎖を含有するタンパク質はゴルジ体に輸送されて、種々の修飾を受けるが、このゴルジ体での修飾は酵母と哺乳類で大きく異なっている (Gemmill, T.R., Trimble, R.B., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1426, 227 (1999))。

哺乳類細胞では、多くの場合、ハイマンノース型糖鎖に  $\alpha$ -マンノシダーゼ I が作用してマンノース数残基を切断する。この過程で生成する糖鎖 ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ) は、ハイマンノース型と呼ばれる糖鎖である。マンノースが 3 残基切断された M5 ハイマンノース型糖鎖 ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ) に N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (GnT) I が作用し、N-アセチルグルコサミンを 1 残基転移し、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  からなる糖鎖が生成する。このようにしてできた糖鎖は混成 (ハイブリッド) 型と呼ばれる。更に、 $\alpha$ -マンノシダーゼ II、GnT-II が作用すると、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  という複合 (コンプレックス) 型と呼ばれる糖鎖構造となり、これ以降、十数種にもおよぶ糖転移酵素群が作用して、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸等を付加し、多様な哺乳類型糖鎖を形成する (図 1)。哺乳類ではハイマンノース型、混成型、複合型いずれの糖鎖も見られるが、タンパク質によってその結合する糖鎖が異なっていたり、また一つのタンパク質内でも型の異なる糖鎖が結合していたりする。これらの糖鎖は、その型や結合している糖鎖の種類によって糖タンパク質の生合成、細胞内ソーティング、抗原性の隠蔽、生体内安定性、臓器ターゲティング特性などの優れた機能を示す (遠藤玉夫、糖鎖工学、産業調査会、64-72 (1992))。

遺伝子組換え体動物細胞を宿主として生産された史上初の糖タンパク質型医薬品となったエリスロポエチンについては、その糖鎖の重要性が指摘されている。エリスロポエチンの糖鎖は受容体との結合には阻害的に働くが、活性構造の保持、および体内動態の改善に決定的な寄与があり、全体として薬理活性の発現に必要不可欠であることが示された (Takeuchi and Kobata, *Glycobiology*, 1, 337-346 (1991))。更に、糖鎖の構造、種類、分岐数 ( $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  に結合する  $\text{GlcNAc}$

によって形成される枝分かれの数) とエリスロポエチンの薬理効果との間に強い相関性が見いだされた (Takeuchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7819-7822 (1989))。分岐構造の発達していないエリスロポエチンでは腎でのクリアランスが早まり、結果として体内滞留時間が短くなることがこの現象の主な原因であると報告されている (Misaizu et al., Blood, 86, 4097-4104 (1995))。これに似た例はフェツインなどの血清糖タンパク質でも見られ、糖鎖の末端のシアル酸を除去することでガラクトースが露出すると、肝細胞表面のレクチンによって認識され、血中から速やかに消失してしまうことが見いだされている (Ashwell and Harford, Annu. Rev. Biochem., 51, 531-554 (1982) ; Morell et al., J. Biol. Chem., 243, 155-159 (1968))。

また、ヒトリソソームに局在する酵素群の多くは、生合成されゴルジ体に輸送されると、そのハイマンノース型糖鎖の非還元末端のマンノース残基の6位にリン酸基が付加され、これがリソソーム酵素特異的な認識マーカーとなる。そしてその高親和性受容体であるマンノース-6-リン酸受容体 (MPR) との結合を介して、他のタンパク質から選別され、プレリソソームへ運ばれ、酸性条件下でMPRから解離した後、更にリソソームへと輸送される (von Figura and Hasilik, Annu. Rev. Biochem., 54, 167-193 (1984))。このリソソーム酵素特異的なリン酸基の付加反応は、2種の酵素反応により行なわれており、これらの遺伝子に遺伝的欠陥を有する場合、リソソームへのターゲティング機構に異常が生じ、リソソーム病と総称される重篤な病態を生じることが知られている (Leroy and DeMars, Science, 157, 804-806 (1967))。したがって、哺乳類型糖鎖と一口に言っても、その構造が機能に大きく関わっていると言える。

一方、酵母では、M8ハイマンノース型糖鎖にマンノースが数残基から100残基以上付加した、マンナン型糖鎖 (外糖鎖) を生成する。Saccharomyces属酵母における外糖鎖の生合成は図2、3で示したような経路で進行すると考えられている (Ballou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3368-3372 (1990))。すなわち、M8ハイマンノース型糖鎖にまず $\alpha$ -1,6結合でマンノースが付加する延長開始反応が起こる (図2, 反応I, B)。この反応を行なう酵素はOCH1遺伝子にコードされるタンパク質であることが明らかになっている (Nakayama et al.,

EMBO J., 11, 2511-2519 (1992))。更に $\alpha$ -1,6結合でマンノースを逐次延長する反応(図2, II)が起こることにより、外糖鎖の骨格となるポリ $\alpha$ -1,6結合マンノース結合が形成される(図2, E)。この $\alpha$ -1,6結合のマンノースには、 $\alpha$ -1,2結合したマンノースの分岐が存在し(図2, 3 : C, F, H)、この枝分かれした $\alpha$ -1,2結合のマンノースの先には、更に $\alpha$ -1,3結合したマンノースが付加することがある(図2, 3 : D, G, H, I)。この $\alpha$ -1,3結合のマンノースの付加は、MNN1遺伝子産物によるものである(Nakanishi-Shindo et al., J. Biol. Chem., 268, 26338-26345 (1993))。またハイマンノース型糖鎖部分および外糖鎖部分にマンノース-1-リン酸が付加した酸性糖鎖も生成することがわかっている(図2, \* ; 前記式(I)中の\*に対応するリン酸化可能部位)。この反応はMNN6遺伝子がコードする遺伝子によることがわかり(Wang et al., J. Biol. Chem., 272, 18117-18124 (1997))、更にこの転位反応を正に制御するタンパク質をコードする遺伝子(MNN4)も明らかとなった(Odani et al., Glycobiology, 6, 805-810 (1996) ; Odani et al., FEBS letters, 420, 186-190 (1997))。

多くの場合に、外糖鎖は不均質なタンパク質産物を生成し、タンパク質の精製を困難にしたり、比活性を低下させたりする(Bekkers et al., Biochim. Biophys. Acta, 1089, 345-351 (1991))。更に糖鎖の構造が大きく異なるため、酵母で生産された糖タンパク質は、哺乳類由来のものと同一の生物活性が検出されなかったり、哺乳類動物などに対して強い免疫原性を有する。このように、哺乳類由来の有用糖タンパク質を生産させる際の宿主としては、酵母は不適当とされている。哺乳類由来のものと同等の生物活性を持った糖タンパク質、すなわち哺乳類型の糖鎖を含有する糖タンパク質を生産できる酵母の開発が、学会や産業界から望まれている。

従って、酵母を用いて哺乳類型糖鎖を生産するためには、まず、前記のような酵母特有の糖タンパク質糖鎖の修飾であるマンノースを多数付加するような反応がおこらず、外糖鎖が付加しなくなり、糖鎖合成がM8ハイマンノース型糖鎖で停止するような糖鎖生合成系を有する変異株を単離することが重要となる。次に、この哺乳類型糖鎖の前駆体であるM8ハイマンノース型糖鎖に、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を上記酵母変異株に導入することにより達成されるはずである。

そこで、以前より外糖鎖が欠失した糖タンパク質を得るために、酵母外糖鎖生成系酵素群の欠損株の使用が検討されてきている。欠損株を得るためには、薬剤や紫外線照射、自然変異により遺伝子突然変異株を取得する場合と、人為的に標的遺伝子を破壊する方法がある。

前者についてはこれまで様々な報告がある。例えば、mnn2変異株は外糖鎖の $\alpha$ -1,6骨格から $\alpha$ -1,2結合を生じる枝分かれのステップに欠損があり、mnn1変異株は分岐先端に $\alpha$ -1,3結合のマンノースを生成するステップに欠損がある。しかし、これらの変異株は外糖鎖の骨格である $\alpha$ -1,6マンノース結合には欠損がないため、いずれも鎖長の長い外糖鎖を生成する。またmnn7, 8, 9, 10変異株などは $\alpha$ -1,6マンノース結合を4-15分子程度しか持たない変異株として単離されているが、これらの変異株も外糖鎖が短くなるだけであり、ハイマンノース型糖鎖で糖鎖伸長が停止するものではない (Ballou et al., J. Biol. Chem., 255, 5986-5991 (1980) ; Ballou et al., J. Biol. Chem., 264, 11857-11864 (1989) )。外糖鎖の付加欠損は、小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送が温度感受性となったsec18などの分泌変異株などでも観察される。しかし、sec変異株では、タンパク質の分泌そのものが高温で阻害されてしまうため、糖タンパク質の分泌生産という目的にはそぐわない。

よって、これらの変異株は目的のハイマンノース型糖鎖を完全には生合成できないため哺乳類糖鎖を生成するための宿主酵母としては不適であると考えられる。

一方、酵母における小胞体 (ER) での糖鎖生合成経路は、生合成が種々の段階で欠損した変異株を単離し、これを生化学的に解析することによって明らかにされてきた。alg (asparagine-linked glycosylation) 変異株は、糖鎖への $[^3\text{H}]$ マンノースの取り込みが糖外鎖を持つ野生型細胞より少なくなったため、放射線による損傷・死滅をまぬがれた変異株を濃縮するという巧妙な選別法により単離された。その中でalg3変異は非許容温度下でDol-pp-GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>5</sub> (Dol-ppはドリコールピロリン酸) を蓄積する (Tanner, W. et al., Biochim. Biophys. Acta., 906, 8199 (1987))。また地神らは $\Delta$ och1mnn1alg3三重変異株を用いて解析を行っている (地神ら、蛋白質 核酸 酵素、Vol. 39, No. 4, p.657 (1994))。マンナン蛋白質糖鎖をPA (2 アミノピリジイン) で蛍光ラベル後、分析すると、

主成分は $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ および $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ と一致する2つのピークを示した。このうち、前者は $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ消化やFAB-MSの結果などから、ERコア糖鎖と同一であることが判明した。一方、後者は $\alpha$ -1,2マンノシダーゼ消化によりManが2分子除去されて $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ を生産し、 $\alpha$ -1,6結合したManを特異的に切断する処理（部分アセトリシス）により、Manが1分子だけ除去された。これらの結果から、この三重変異株の生産する $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の糖鎖は前記式（II）に示した不完全なコア型糖鎖構造であることが判明した。なお、この三重変異株で $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ だけでなく $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ も生成する理由としては、ドリコールピロリン酸上で $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-pp-Dol}$ を蓄積する $\text{alg3}$ 変異の性質がリーキー（leaky）なためである。

一方、後者については近年の遺伝子工学的手法の発達により、標的遺伝子を複数個破壊した欠損株を構築できるようになった。

酵母の中には栄養要求性変異を持つものが知られており、栄養要求性変異としては、leu2変異、trp1変異、ura3変異、ade2変異、his3変異などがある（大嶋泰治編著、生物化学実験法39、酵母分子遺伝学実験法、119-144（1996））。変異のない元の遺伝子を導入すれば、これらの栄養要求性を解除することができ、培地中に必要成分を加えなくても生育が可能となる。この原理を基に酵母の遺伝子破壊を行うことができる（図4）。この方法では、まず、試験管内での操作により、プラスミド上の標的遺伝子DNAを分断あるいは部分欠失させ、そこに適当な選択マーカー遺伝子DNAを挿入して標的遺伝子の上流部と下流部の間に選択マーカーがサンドイッチされた構造体を作製する。次に、この構造を持つ線状DNAを酵母細胞に導入することにより、導入断片の両端と染色体上の標的遺伝子との相同部分の間で2回の組み換えを起こし、選択マーカーを挟み込んだDNA構成体で置換するものである（Rothstein, Methods Enzymol., 101, 202-211（1983））。この方法では、1つの遺伝子を破壊するのに1つの選択マーカーが必要となる。

外糖鎖を欠損した酵母株の分子育種は既に特開平6-277086や特開平9-266792に記載されている。しかし、特開平6-277086に記載された二重変異株（ $\Delta\text{och1}$   $\Delta\text{mnn1}$ ）で生産された糖タンパク質糖鎖には、リン酸残基を持つ酸性糖鎖が含



まれていることがわかった。この酸性糖鎖はヒトなど哺乳類由来の糖鎖には存在しない構造であり、哺乳類の体内で異物と認識されて、抗原性を示すと思われる (Ballou, *Methods Enzymol.*, 185, 440-470 (1990) )。そこで、更にマンノース-1-リン酸転移を正に制御する遺伝子 (MNN4) およびO-結合型糖鎖の延長反応を行なうマンノース転移酵素遺伝子 (KRE2) の機能を破壊した四重変異株 (特開平9-266792に記載) が構築された。これに記載された酵母株の生産する糖タンパク質の糖鎖は、目的のM8ハイマンノース型糖鎖を有していることが明らかとなった。更にこの破壊酵母に Aspergillus saitoi 由来の  $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子を導入した株は、マンノースが1～数残基切断されたハイマンノース型糖鎖 ( $\text{Man}_{5,8}\text{GlcNAc}_2$ ) を有することが明らかとなっている (Chiba et al., *J. Biol. Chem.*, 273, 26298-26304 (1998))。

また、新聞らは更に alg3 変異を導入した別種の四重変異株を作成している (Shimma Y. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 256, 469-480 (1997); Wang et al., *J. Biol. Chem.* 272, 18117-18124 (1997); 新聞陽一、地神芳文、第32回酵母遺伝学フォーラム要旨集、p.64 (1999) ; Shimma Y. et al., Abstracts of XIX International Conference On Yeast Genetics and Molecular Biology, p. 443 (1999))。

ところが、これらの酵母株の生産する糖タンパク質の糖鎖は、哺乳類にも存在し抗原性を有さないが、エリスロポエチンの例からも明らかなように、ハイマンノース型糖鎖を含有する糖タンパク質は、その糖鎖構造から哺乳類細胞から生産された糖タンパク質と同等の活性を示さないことが予想される。また、この四重変異株は標的遺伝子の破壊により、劣性の遺伝子変異である宿主の4個の選択マーカー (leu2, ura3, lys2, trp1) の以後の使用が不可能となる。更に残った栄養要求性マーカーのうち1つについては、突然変異ではなく人為的に破壊されているため、染色体上のこれらのマーカー遺伝子座との相同性を利用した酵母染色体上への組み込みは行なえない。よって、これらの酵母株に対し、哺乳類型の糖鎖を生産するのに必要な糖鎖加水分解酵素遺伝子群、糖転移酵素遺伝子群、糖ヌクレオチド輸送体遺伝子群に属する遺伝子や、有用な糖タンパク質の生産を行なうための遺伝子を複数個導入することは困難である。前述のように、哺乳類型の糖

鎖を生産するのに必要な糖転移酵素群は十数個あることが知られており、この酵母細胞を宿主とすることは糖鎖構造を思い通りに改変制御するためには不適であると考えられる。

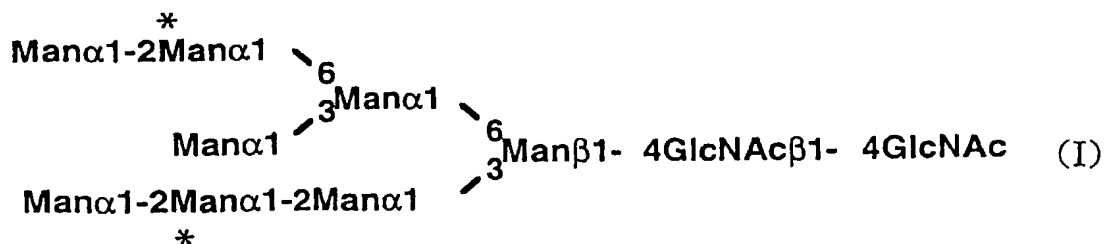
本発明の課題は、Asn-結合型糖タンパク質の酵母での生産における上記の問題を克服し、ヒトおよび他の哺乳類細胞の生産するハイマンノース型、混成型、複合型と同一の糖鎖構造を持つ糖鎖、および該糖鎖を含有する糖タンパク質を酵母を用いて製造する方法を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、選択マーカーである栄養要求性変異を保持させつつ、即ち栄養要求性を相補する遺伝子を最終的に導入することなく、酵母に特異的な外糖鎖を生合成する遺伝子のうち、初発の延長付加反応を行なう $\alpha$ -1,6マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 (OCH1)、糖鎖の非還元末端にマンノースを付加する $\alpha$ -1,3マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 (MNN1)、およびマンノース-1-リン酸の付加を制御する遺伝子 (MNN4) を破壊した新規な酵母変異株 (栄養要求性三重変異株) によれば、哺乳類型糖鎖と同一の糖鎖構造を持つ糖鎖を生産できること、また該変異株に哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を導入することで様々な哺乳類型糖鎖を生産できることを見い出した。

すなわち、本発明は、以下の (1)～(14) に関する。

(1) och1変異、mnn1変異、mnn4変異の変異形質と、少なくとも4個以上の栄養要求性変異形質を持つことを特徴とし、下記式 (I):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。＊はリ

ン酸化可能部位を示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質生産能を有する酵母変異株。

(2) 栄養要求性を相補する遺伝子を最終的に導入することなく、OCH1遺伝子を破壊したoch1変異 ( $\Delta och1$ )、MNN1遺伝子を破壊したmnn1変異 ( $\Delta mnn1$ )、MNN4遺伝子を破壊したmnn4変異 ( $\Delta mnn4$ ) の変異形質と、少なくとも1個以上の栄養要求性変異形質を有することを特徴とし、上記式 (I) で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質生産能を有する酵母変異株。

(3) 栄養要求性変異形質がura3変異、his3変異、leu2変異、ade2変異、trp1変異、can1変異から選ばれる、上記(1) または(2) に記載の酵母変異株。

(4) サッカロミセス (Saccharomyces) 属に属する酵母である、上記(3) に記載の酵母変異株。

(5) サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) に属する酵母である、上記(4) に記載の酵母変異株。

(6) サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) TIY19 株である、上記(5) に記載の酵母変異株。

(7) 上記(1) ~ (6) のいずれかに記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に上記式 (I) で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取し、採取した糖タンパク質より該オリゴ糖鎖を回収することを特徴とする、オリゴ糖鎖の製造法。

(8) 上記(1) ~ (6) のいずれかに記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に上記式 (I) で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

(9) 哺乳類由来のアスパラギン結合型糖タンパク質をコードする遺伝子を含む組換えプラスミドにて形質転換させた上記(1) ~ (6) のいずれかに記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に上記式 (I) で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タン

パク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

(10) och1変異、mnn1変異、mnn4変異の変異形質を持つ酵母変異株に、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を、少なくとも二つ以上導入した酵母変異株。

(11) 上記(1)～(6)のいずれかに記載の酵母変異株に、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を、少なくとも一つ以上導入した酵母変異株。

(12) 上記(10) または (11)に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取し、採取した糖タンパク質より該オリゴ糖鎖を回収することを特徴とする、オリゴ糖鎖の製造法。

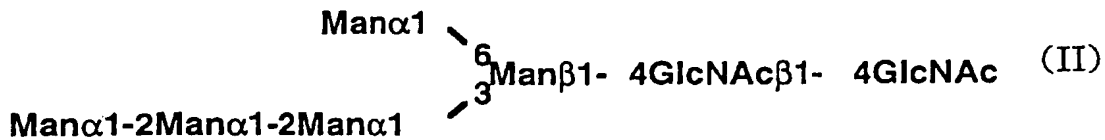
(13) 上記(10) または(11) に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

(14) 哺乳類由来のアスパラギン結合型糖タンパク質をコードする遺伝子を含む組換えプラスミドにて形質転換させた上記(10) または(11) に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

本発明者らはまた、上記酵母 $\alpha$ -1,6マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 (OCH1)、糖鎖の非還元末端にマンノースを付加する $\alpha$ -1,3マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 (MNN1)、およびマンノース-1-リン酸の付加を制御する遺伝子 (MNN4) を破壊した上記酵母変異株 (栄養要求性三重変異株) に、更にERでの糖鎖生合成に関与する遺伝子 (ALG3) を破壊した新規な酵母変異株 (栄養要求性四重変異株) によれば、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子の1つである $\alpha$ -mannosidase II遺伝子を導入することなく、その他の哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を導入することにより、様々な哺乳類型糖鎖を生産できることを見い出した。

すなわち、本発明は、更に以下の (15) ~ (30) に関する。

(15) och1変異、mnn1変異、mnn4変異、alg3変異の変異形質と、少なくとも 5 個以上の栄養要求性変異形質を持つことを特徴とし、下記式 (II):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質生産能を有する酵母変異株。

(16) 栄養要求性を相補する遺伝子を最終的に導入することなく、OCH1遺伝子を破壊したoch1変異 ( $\Delta$ och1)、MNN1遺伝子を破壊したmnn1変異 ( $\Delta$ mnn1)、MNN4遺伝子を破壊したmnn4変異 ( $\Delta$ mnn4)、ALG3遺伝子を破壊したalg3変異 ( $\Delta$ alg3) の変異形質と、少なくとも 1 個以上の栄養要求性変異形質を持つことを特徴とし、上記式 (II) で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質生産能を有する酵母変異株。

(17) 栄養要求性変異形質がura3変異、his3変異、leu2変異、ade2変異、trp1変異、can1変異から選ばれることを特徴とする、上記(15)または(16)に記載の酵母変異株。

(18) サッカロミセス (Saccharomyces)属に属する酵母である、上記(17)に記載の酵母変異株。

(19) サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) に属する酵母である、上記(18)に記載の酵母変異株。

(20) サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) YS134-4A株である、上記(19)に記載の酵母変異株。

(21) 上記(15)~(20)のいずれかに記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に上記式 (II) で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取し、採取した糖タンパク質より該オリゴ糖鎖を回収することを特徴とする、オリゴ糖鎖の製造法。

(22) 上記(15)～(20)のいずれかに記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に上記式 (II) で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

(23) 哺乳類由来のアスパラギン結合型糖タンパク質をコードする遺伝子を含む組換えプラスミドにて形質転換させた上記(15)～(20)のいずれかに記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に上記式 (II) で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

(24) och1変異、mnn1変異、mnn4変異、alg3変異の変異形質を持つ酵母変異株に、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を、少なくとも二つ以上導入した酵母変異株。

(25) 上記(15)～(20)のいずれかに記載の酵母変異株に、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を、少なくとも一つ以上導入した酵母変異株。

(26) 上記(24)または(25)に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取し、採取した糖タンパク質より該オリゴ糖鎖を回収することを特徴とする、オリゴ糖鎖の製造法。

(27) 上記(24)または(25)に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

(28) 哺乳類由来のアスパラギン結合型糖タンパク質をコードする遺伝子を含む組換えプラスミドにて形質転換させた上記(24)または(25)に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

(29)  $\alpha$ -マンノシダーゼII遺伝子が導入され、 $\alpha$ -マンノシダーゼII活性を有する酵母株。

(30) 上記(29) に記載の酵母株を培地に培養し、培養物中に生成蓄積された $\alpha$ -マンノシダーゼIIを採取することを特徴とする、 $\alpha$ -マンノシダーゼIIの製造法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願平成 11 年第 233215 号の明細書及び／または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、哺乳類動物での一般的な N-結合型糖鎖の生合成経路を示す。

図 2 は、酵母 (*S. cerevisiae*) における N-結合型糖鎖の生合成経路を示す。図中、H、C、E は、それぞれ図 3 の I、D、F に続く。

図 3 は、酵母 (*S. cerevisiae*) における N-結合型糖鎖の生合成経路 (続き) を示す。

図 4 は、従来の酵母遺伝子の破壊法を示す。

図 5 は、栄養要求性を相補する遺伝子を最終的に導入することなく、遺伝子を破壊する方法を示す。

図 6 は、TIY19 株細胞表層マンナンタンパク質糖鎖の構造解析を示す。

図 7 は、 $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子を導入した TIY19 株の細胞表層マンナンタンパク質糖鎖の Amide-80 カラムでの構造解析を示す。

a : TIY19 株のマンナン糖タンパク質の糖鎖

b :  $\alpha$ -1,2-mannosidase を導入した TIY19 株のマンナン糖タンパク質の糖鎖

図 8 は、 $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子を導入した TIY19 株の細胞表層マンナンタンパク質糖鎖の ODS-80T<sub>M</sub> カラムでの構造解析を示す。

a : 式 (III) で示される構造の標準糖鎖

b : 図 6 で分取した画分

図 9 は、GnT-I 活性測定の結果を示す。

図 10 は、 $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子と GnT-I 遺伝子を導入した TIY19 株の細胞表層マンナンタンパク質糖鎖の Amide-80 カラムでの構造解析を示す。

A : ベクターのみを導入した TIY19 株の糖鎖構造解析

B :  $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子と GnT-1 遺伝子を導入した TIY19 株の糖鎖構造解析

a : Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA

b : GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA

c : Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA

d : Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA

e : Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA

図 1 1 は、 $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子と GnT-I 遺伝子を導入した TIY19 株の細胞表層マンナンタンパク質糖鎖の ODS-80T<sub>M</sub> カラムでの構造解析を示す。

A : 標準品の混合物

B : 図 1 0 . B で分取した画分

図 1 2 は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子を導入した YPH500 株の細胞抽出液を用いたウエスタンブロット解析を示す。

A : ベクターのみ (pYEX-BX-3HA) を導入した YPH500 株からの細胞抽出液のウエスタンブロット解析結果

B : キメラ  $\alpha$ -mannosidase-II 遺伝子を含むベクター (pYEOM2-HA) を導入した YPH500 株の細胞抽出液のウエスタンブロット解析結果

図 1 3 は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子を導入した YPH500 株の細胞抽出液を用いた  $\alpha$ -mannosidase II 活性測定の結果を示す。

A : ベクターのみ (pYEX-BX-3HA) を導入した YPH500 株での活性測定結果

B : キメラ  $\alpha$ -mannosidase-II 遺伝子を含むベクター (pYEOM2-HA) を導入した YPH500 株での活性測定結果

a : GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA

b : GlcNAcMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA

図 1 4 は、FGF 遺伝子を導入した TIY48 株 (上段)、及び FGF 遺伝子と  $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子を導入した TIY53 株 (下段) の FGF 糖鎖の Amido-80 カラムでの構造解析を示す。

符号の説明

GlcNAc, GN : N- アセチルグルコサミン

Man, M : マンノース

PA : 2-アミノピリジル化



### 配列表の簡単な説明

配列番号 1 は、MNN1遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマーA を示す。

配列番号 2 は、MNN1遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマーB を示す。

配列番号 3 は、MNN1遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマーC を示す。

配列番号 4 は、MNN1遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマーD を示す。

配列番号 5 は、MNN4遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマーE を示す。

配列番号 6 は、MNN4遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマーF を示す。

配列番号 7 は、MNN4遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマーG を示す。

配列番号 8 は、MNN4遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマーH を示す。

配列番号 9 は、ALG3遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマーI を示す。

配列番号 10 は、ALG3遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマーJ を示す。

配列番号 11 は、ALG3遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマーK を示す。

配列番号 12 は、ALG3遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマーL を示す。

配列番号 13 は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子の N 末端側領域を増幅するためのプライマーM を示す。

配列番号 14 は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子の N 末端側領域を増幅するためのプライマーN を示す。

配列番号 15 は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子の中央部領域を増幅するためのプライマーO を示す。

配列番号 16 は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子の中央部領域を増幅するためのプライマーP を示す。

配列番号 17 は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子の C 末端側領域を増幅するためのプライマーQ を示す。

配列番号 18 は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子の C 末端側領域を増幅するためのプライマーR を示す。

配列番号 19 は、HA-tag を 3 回反復させるように結合させる遺伝子をコードする二本鎖DNAの配列S を示す。

配列番号 20 は、OCH1遺伝子の膜貫通領域をコードする二本鎖DNAの配列T

を示す。

配列番号 2 1 は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子の触媒領域の一部を増幅するためのプライマー U を示す。

配列番号 2 2 は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子の触媒領域の一部を増幅するためのプライマー V を示す。

配列番号 2 3 は、ヒト UDP-GlcNAc Transporter 遺伝子を増幅するためのプライマー W を示す。

配列番号 2 4 は、ヒト UDP-GlcNAc Transporter 遺伝子を増幅するためのプライマー X を示す。

配列番号 2 5 は、ヒト prepro  $\alpha$ -factor と FGF 遺伝子を増幅するためのプライマー Y を示す。

配列番号 2 6 は、ヒト prepro  $\alpha$ -factor と FGF 遺伝子を増幅するためのプライマー Z を示す。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の酵母変異株に必要な変異形質は、酵母特有の外糖鎖生合成系遺伝子の変異であり、具体的には och1 変異、mnn1 変異、mnn4 変異、あるいは och1 変異、mnn1 変異、mnn4 変異、alg3 変異である。

即ち、上記の変異を有する限り、自然変異株であっても人為変異株であってもよい。

また、本発明の酵母変異株における外来遺伝子を導入するための栄養要求性変異形質は、使用する酵母株に規定されるものであり、具体的には ura3 変異、his3 変異、leu2 変異、ade2 変異、trp1 変異、can1 変異から選ばれる。栄養要求性変異形質の数は導入する遺伝子の数によるが、一般的に、1 つの遺伝子を導入するのに 1 個の栄養要求性変異形質が必要である。複数の遺伝子を導入する場合は、導入する遺伝子断片が長く、導入効率が低下し、ひいては発現効率も低下するので、導入遺伝子の数が多いほど多数の栄養要求性変異形質が必要となる。

本発明において、「栄養要求性を相補する遺伝子」とは、アミノ酸、核酸等の

生体成分の合成系の遺伝子である。変異形質はこれらの遺伝子が機能しないような変異が入っているものなので、相補する遺伝子は元の機能する遺伝子そのものである。よって、元の酵母株由来の遺伝子が望ましい。

また、「栄養要求性を相補する遺伝子を最終的に導入することなく」とは、一つまたはそれ以上の遺伝子を破壊する（変異形質を導入する）のに1個またはそれ以上の選択マーカー、即ち、栄養要求性変異形質を利用するが、破壊後も破壊遺伝子数と同数の当該形質が残っており、再度の遺伝子破壊の際に繰り返し同じ当該形質を使用できることをいう（図5参照）。

本発明における、外来遺伝子を導入するための栄養要求性変異形質を保持し、かつ酵母特有の外糖鎖合成系遺伝子が破壊された酵母変異株（以下、栄養要求性変異株）は以下のようにして作製することができる。

まず、標的遺伝子の破壊に必要なDNA遺伝子断片の単離は、Saccharomyces cerevisiaeのゲノムプロジェクトにより、いずれもその染色体上の配座が既知である（Goffeau et al., Nature, 387 (suppl.), 1-105 (1997)) ことから、米国ATCC (American Type Culture Collection) など公的な機関から標的遺伝子の近傍を含む遺伝子断片の分与を受けることが可能である（ATCC Recombinant DNA materials, 3rd edition, 1993）。また、一般的手法にしたがってS. cerevisiae からゲノムDNAを抽出し、目的遺伝子を選別することにより可能である。上記において、S. cerevisiaeからゲノムDNAの抽出は、例えば、Cryerらの方法（Methods in Cell Biology, 12, 39-44 (1975)）およびP. Philippsenらの方法（Methods Enzymol., 194, 169-182 (1991)）に従って行なうことができる。

標的遺伝子は、PCR法により増幅させてから遺伝子破壊を行なう。PCR法は、インビトロ (*in vitro*)でDNAの特定断片をその領域の両端のセンス・アンチセンスプライマー、耐熱性DNAポリメラーゼ、DNA増幅システム等の組み合わせを用いて約2～3時間で数十万倍以上に増幅できる技術であるが、標的遺伝子の増幅には、プライマーとして25～30merの合成1本鎖DNAを、鋳型としてゲノムDNAを用いる。

本発明において標的遺伝子の破壊は、Rothstein, Methods Enzymol., 101,

202-211 (1983)に開示される方法に基本的に従って行いうる。本方法は、まず、プラスミド上の標的遺伝子DNAを分断あるいは部分欠失させ、そこに適当な選択マーカー遺伝子DNAを挿入して標的遺伝子の上流部と下流部の間に選択マーカーがサンドイッチされた構造体を作製し、次に、この構造体を酵母細胞に導入する。以上の操作により、導入断片（選択マーカーを挟み込んだDNA構造体）の両端と染色体上の標的遺伝子との相同部分の間で2回の組み換えを起こし、染色体上の標的遺伝子が導入断片で置換される。

具体的に、MNN1遺伝子破壊株の作製を例にとり説明する。Alaniらによって構築された、サルモネラ菌のhisG遺伝子DNA断片がURA3遺伝子の両端に結合されているプラスミド (Alani et al., Genetics, 116, 541-545 (1987))からhisG-URA3-hisGのカセットを制限酵素で切りだし、プラスミド上の標的遺伝子に挿入し、破壊された対立遺伝子を構築する。このプラスミドを用いて染色体の標的遺伝子と置換して遺伝子破壊株を得る。染色体に挿入されたURA3遺伝子はhisGではさまれており、hisG配列間での相同的組み換えにより1コピーのhisGとともに染色体から脱落する。染色体上の標的遺伝子にはなおも1コピーのhisG断片が残り破壊されたままであるが、宿主細胞はUra<sup>-</sup>表現形となる（図5）。このhisG間での相同的組み換えは5-フルオロオロト酸（5-FOA）により行なうことができる。ura3変異株は5-FOAに耐性であり (Boeke et al., Mol. Gen. Genet., 197, 345-346 (1984); Boeke et al., Methods Enzymol., 154, 165-174 (1987))、Ura<sup>3+</sup>表現形を持つ細胞株は5-FOA培地に生育できなくなる。よって、5-FOAを加えた培地で耐性形質を持つ株を分離すれば、再びURA3を用いての操作が可能である。

以下、このMNN1遺伝子破壊株に、同様な手法にてMNN4遺伝子破壊、OCH1遺伝子破壊を行うことにより、本発明の目的とする栄養要求性三重変異株（Δ och1 Δ mnn1 Δ mnn4）を得ることができる。また更に同様な手法にてALG3遺伝子破壊を行うことにより、本発明の目的とする栄養要求性四重変異株（Δ och1 Δ mnn1 Δ mnn4 Δ alg3）を得ることができる。

従って、上記の手法により人為的に遺伝子破壊を行った「人為破壊株」では、元の酵母株を有する栄養要求性変異形質が遺伝子破壊操作により損なわれない。

従って、該人為変異株の有する栄養要求性変異形質の数は、三重変異株であっても四重変異株であっても元の酵母株が有する栄養要求性変異形質の数に等しく、少なくとも1個以上有することになる。

一方、上記の手法によらず遺伝子破壊が自然に起こっている「自然変異株」では、上記の手法を用いることはないので栄養要求性変異形質の数の増減とは関係がない。

本発明におけるM8ハイマンノース糖鎖を生産する酵母変異株を作成する場合、従来法に基づきOCH1、MNN1、MNN4遺伝子を破壊するのに6個の栄養要求性変異形質を保有する酵母株を用いて作成すると、栄養要求性変異形質は3個しか残らないので、該変異株の有する栄養要求性変異形質の数は少なくとも4個以上となる。

また、OCH1、MNN1、MNN4遺伝子変異に更にALG3遺伝子に変異が生じたM8ハイマンノース糖鎖を生産する酵母変異株を作成する場合、従来法による作成ではmnn1変異、alg3変異の自然変異株を利用できるが、更にOCH1、MNN4遺伝子を破壊する必要があるため2個の栄養要求性変異形質を使用することになる。よって、上記の6個の栄養要求性変異形質を保有する酵母株を用いると、栄養要求性変異形質は4個しか残らないので該変異株の栄養要求性変異形質の数は少なくとも5個以上となる。

なお、上記操作で選択マーカーとしては、URA3などの栄養要求性マーカーのみならず、G418、セルレニン、オーレオバシジン、ゼオシン、カナバニン、シクロヘキシミド、テトラサイクリン等の薬剤に対し、耐性を付与するマーカーなども使用できる。また、メタノールやエタノールなどに対する溶剤耐性や、グリセロールや塩などに対する浸透圧耐性、銅などの金属イオン耐性等を付与する遺伝子をマーカーにすることで、遺伝子の導入や破壊を行うことも可能である。

上記操作における、DNAの細胞への導入およびこれによる形質転換の方法としては、一般的な方法、例えば、ベクターとしてファージを用いる場合は、大腸菌宿主にこれを感染させる方法等により、効率よく宿主にDNAを取り込ませることができる。またプラスミドを用いて酵母を形質転換する方法としては、リチウム塩で処理して自然にDNAを取込みやすい状態にしてプラスミドを取り込ま

せる方法や、あるいは電氣的にDNAを細胞内に導入する方法を採用できる (Becker and Guarente, *Methods Enzymol.*, 194, 182-187 (1991))。

また、上記操作における、DNAの単離・精製等は何れも常法、例えば大腸菌の場合、アルカリ/SDS法とエタノール沈殿によるDNA抽出、更にRNase処理、PEG沈殿法などによりDNAを精製できる。また、遺伝子のDNA配列の決定等も通常の方法、例えばジデオキシ法 (Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 5463-5467 (1977)) 等により行なうことができる。更に上記DNA塩基配列の決定は、市販のシーケンスキット等を用いることによっても容易に行ない得る。

以上のようにして作製された栄養要求性変異株は、ハイマンノース型の哺乳類型糖鎖を生産することができるが、さらにハイブリッド型、複合型の糖鎖哺乳類型糖鎖を生産させるためには、該変異株に酵母特有の糖鎖加水分解酵素遺伝子群、糖転移酵素遺伝子群を導入する。また、本来糖鎖の生合成は前述のようにER、ゴルジ体内で行われるので、糖鎖の原料となる糖ヌクレオチドがこれらの器官に存在することが必要であるが、酵母内ではこれらの糖ヌクレオチド輸送体はないか、有っても実際に糖鎖が生合成される器官には微量しか存在しない。従って、細胞質内で生合成された糖ヌクレオチドを細胞質からER、ゴルジ体内へ移動させる糖ヌクレオチド輸送体遺伝子群が更に必要である。

従って、本発明においては、上記の糖鎖加水分解酵素遺伝子群、糖転移酵素遺伝子群、糖ヌクレオチド輸送体遺伝子群に属する遺伝子を「哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子」という。

糖鎖加水分解酵素遺伝子群としては、 $\alpha$ -マンノシダーゼ ( $\alpha$ -mannosidase I,  $\alpha$ -mannosidase II)等の遺伝子、糖転移酵素遺伝子群としては、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (GnT-I, GnT-II, GnT-III, GnT-IV, GnT-V)、ガラクトシルトランスフェラーゼ (GalT)、フコシルトランスフェラーゼ (FucT)等の遺伝子、糖ヌクレオチド輸送体遺伝子群としては、UDP-GlcNAc Transporter, UDP-Gal Transporter 等の遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子は哺乳類由来の遺伝子を単離して利用することもできるし、また遺伝子を合成することによっても可能である。

上記の「哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子」は、上記の1種または2種以上の遺

伝子群に属する遺伝子を、目的とする糖鎖を生産するのに必要な数だけ導入する。導入する遺伝子が複数の場合は、それらの遺伝子が同種の遺伝子群に属していても、互いに異種の遺伝子群に属していてもよい。

上記の栄養要求性変異株、あるいは、該栄養要求性変異株に上記の外来遺伝子群を導入した変異株を、培地に培養すれば、酵母特有の外糖鎖の含量が低下し、哺乳類細胞の生産するハイマンノース型糖鎖 ( $\text{Man}_5\text{-}_8\text{GlcNAc}_2$ )、混成型糖鎖 ( $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ )、複合型糖鎖 ( $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 等) と同一の  $\text{Asn}$ 結合型糖鎖を含有する糖タンパク質を、酵母細胞内または細胞外に生産させることができる。

具体的には、栄養要求性変異株として三重変異株 ( $\Delta\text{och1}\Delta\text{mnn1}\Delta\text{mnn4}$ )を用いる場合は、該変異株に  $\alpha$ -mannosidase I 遺伝子と GnT-I 遺伝子を導入することにより、混成型糖鎖を生産させることができ、また、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子 ( $\alpha$ -mannosidase II、GnT-II、GalT、UDP-GlcNAc Transporter, UDP-Gal Transporter 遺伝子) を導入することにより、二本鎖複合型糖鎖 ( $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ )を生産させることができる。

さらに、GnT-IV, GnT-V 遺伝子を導入することにより、三本鎖複合型糖鎖、四本鎖複合型糖鎖を生産させることもできる。

また、栄養要求性変異株として四重変異株 ( $\Delta\text{och1}\Delta\text{mnn1}\Delta\text{mnn4}\Delta\text{alg3}$ )を用いる場合は、 $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子を導入することなく、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子 ( $\alpha$ -mannosidase I, GnT-I, GnT-II, Gal-T, UDP-GlcNAc Transporter, UDP-Gal Transporter 遺伝子) を導入することにより、二本鎖複合型糖鎖 ( $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ )を生産させることができる。

生成する糖鎖、及び糖タンパク質を高収率で得るためには、上記酵素を適切な器官 (例えばゴルジ体) にて高発現をさせることが望ましい。よって酵母のコドン使用頻度に合わせた遺伝子を用いることは有効である。また酵素を適切な器官に局在させるためには、酵母のシグナル配列等を付加することも有効である。遺伝子の導入については  $2\ \mu\text{m}$  プラスミドタイプ (YEp タイプ)、染色体組み込み型タイプ (YIp タイプ) 等ベクターを用いる方法が考えられるが、目的に応じて使い分けることができる。YEp タイプのベクターは遺伝子を多コピーで導入でき

るので、遺伝子を大量に発現させることができる。一方、YIpタイプのベクターは遺伝子を染色体に存在させることができるためその遺伝子を安定的に保持することができる。遺伝子を発現させるために必要プロモーターはGAPDH, PGK等の構成的発現プロモーター、GAL1, CUP1等の誘導発現プロモーターなど特に限定されないが、糖鎖の生産には構成的発現プロモーターが望ましい。しかし糖鎖加水分解酵素、糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体遺伝子を1種または複数発現させた場合には酵母の増殖に影響を及ぼすことがあるので、その場合には誘導プロモーターの使用や、遺伝子を導入する順序を考慮する必要がある。

また、本発明における栄養要求性変異株には、上記の如く人為的な遺伝子破壊法によって得られる変異株以外に、薬剤や紫外線照射、自然変異により得られる変異株も含まれる。この自然変異株も同様に、前述の哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子（糖鎖加水分解酵素遺伝子群、糖転移酵素遺伝子群、糖ヌクレオチド輸送体群に属する遺伝子）を導入することにより、哺乳類型糖鎖や哺乳類型糖鎖を有する糖タンパク質の生産を行うことが可能である。

更に、上記の糖鎖を持つ異種生物由来の糖タンパク質を生産させるためには、上記酵母変異株を宿主として、目的の糖タンパク質をコードする遺伝子（cDNAなど）を酵母で発現出来るプロモーターの下流に接続した遺伝子を作製し、相同組換えによって上記酵母宿主に組み込むか、或いは、プラスミドに挿入して上記宿主を形質転換することにより、上記宿主の形質転換体を作製し、これを公知の方法により培養することにより、酵母細胞内または細胞外に生産された目的の糖タンパク質を回収できる。

上記の酵母変異株の培養は、酵母の培養に慣用される常法に従って行なうことができる。例えば、Difco社から供給される各種の培地成分を添加し、かつプラスミドの複製・保持に必要なマーカーによって供給可能となるアミノ酸を除いた合成培地（炭素源、窒素源、無機塩類、アミノ酸、ビタミン等を含む）等を利用できる（Sherman, Methods Enzymol., 194, 3-57 (1991)）。

上記の培養物（培養液、培養菌体）から糖タンパク質を単離精製するためには、通常のタンパク質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超



音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) セファロース等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、His Bindレジン (Novagen社製) などを用いたアフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

#### 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、これらの実施例は本発明の技術的範囲を何等限定するものではない。

〔実施例 1〕 哺乳類型糖鎖生産能を有する酵母変異株 ( $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 栄養要求性三重変異株) の育種

##### (1) $\Delta mnn1$ 栄養要求性変異株の作製とその性質

すでに報告のあるpNK51(Alani et al., Genetics, 116, 541-545 (1987))より、URA3遺伝子の両端にサルモネラ菌hisG遺伝子がダイレクトリピートで結合しているカセット (HUH) をBglIIとBamHIで切断し、大腸菌プラスミドpSP73のBamHI部位に挿入した。このプラスミドをpSP73-HUHと命名した。

MNN1遺伝子は、酵母第 5 番染色体動原体近傍に位置し、MNN1遺伝子の DNA塩基配列は、GenBankデータベースにL23753で登録されている(Yip et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9, 2723-2727 (1994))。 MNN1遺伝子の 5' 領域をプライマーA(GGATCCGAAGAAAACCTAATACATTGAAGT : 配列番号 1) とプライマーB(GCATGCCCTTTGGTTTAATATAAATCTCCGGAGTGC : 配列番号 2) を用いて、また、3' 領域をプライマー

C(GCATGCTACATAACTCCAATCAGCAGCAAATATGTC : 配列番号 3) とプライマーD(GCGGCCGCGTGTCTGTTCTCGGGTAACGTTTAAACCAAT : 配列番号 4) を用いて、それぞれPCRで増幅した。これらのDNA断片をHIS3マーカーを持つプラスミドpHYHのSphI部位に組み込み、pHYH  $\Delta$  mnn1を作製した。MNN1遺伝子をHUHカセットを用いて破壊するために、1.8KbのSphI断片をpHYH  $\Delta$  mnn1より取得し、pSP73-HUHのSphI部位に挿入したpSP73-  $\Delta$  mnn1::HUH を構築した。本プラスミドをNotI部位で切断することにより直鎖化し、野生株W303-1A(MATa leu2-3, 112his3-11, 15 ade2-1 ura3-1 trp1-1 can1-100)を酢酸リチウム法 (Ito et al., J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) を用いて形質転換した。形質転換後、SD-Ura (2%グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製)、ウラシルを除く核酸塩基、およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) ) 培地のプレートにまいて、30℃で2日間培養し、形質転換体を得た。

形質転換体よりゲノムDNAを調製し、PCR法によりウラシルマーカーがMNN1領域の染色体に組み込まれていることを確認し、TIY1株とした。

本株を、5-FOAを含有したYSD 培地 (1%酵母抽出液、2%グルコース、アデニン (40 mg/L)、ウラシル(20mg/L)) にて選抜を行ない、URA3遺伝子脱落株を得た。上記の方法と同様にPCR法を用いてURA3遺伝子を脱落させたmnn1破壊株を確認した。 $\Delta$  mnn1::hisGを含む本株をTIY3株とした。

MNN1破壊株は、非還元末端の $\alpha$ -1,3結合のマンノースを欠損しているため、N-結合型修飾をうけるインベルターゼの移動度が、野生株より早くなることが知られている。YPAD培地にて培養した野生株およびTIY3株をそれぞれシュクロース0.2%を含む栄養培地 (1%酵母抽出液、2% Bactoペプトン、アデニン (40 mg/L)) に再懸濁し、3時間培養した。菌体を回収したのち、SDSサンプルバッファーに懸濁しガラスビーズにて粉碎したのち、上清を用いて6 % SDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。インベルターゼの検出はシュクロースで誘導後、トリフェニルテトラゾリウムを用いて活性染色を行った (Ballou, Methods Enzymol., 185, 440-470 (1990))。その結果、TIY3株の生産するインベルターゼは、野生株のものより移動度が早いことを確認した。

## (2) $\Delta mnn1 \Delta mnn4$ 栄養要求性二重変異株の作製とその性質

MNN4遺伝子は、酵母第11番染色体に位置し、MNN4遺伝子のDNA塩基配列は、GenBankデータベースにD83006で登録されている(Odani et al., Glycobiology, 6, 805-810 (1996))。 MNN4遺伝子の3'領域をプライマーE (AGATGCATACTAGTGGGCCCATTGTGATTGGAAT : 配列番号5) とプライマーF (CCCCCGAATTTCGTGTGAAGGAATAGTGACG : 配列番号6) を用いて、また、5'領域をプライマーG (CCCCCGAATTCAAGTCGGAGAACCTGACTG : 配列番号7) とプライマーH (ATGGGCCCCACTAGTATGCATCTCGCGTGGCATGG : 配列番号8) を用いて、それぞれPCRで増幅した。これらのDNA断片をHUHカセットを持つ前記pSP73-HUHのEcoRI部位に組込み、pSP73- $\Delta mnn4::$ HUH を作製した。本プラスミドをSpeI部位で切断することにより直鎖化し、TIY3株を酢酸リチウム法を用いて形質転換した。形質転換後、SD-Ura培地のプレートにまいて、30℃で2日間培養し、形質転換体を得た。

形質転換体よりゲノムDNAを調製し、PCR法によりウラシルマーカがMNN4領域の染色体に組込まれていることを確認し、TIY9株とした。

本株を、5-FOAを含有したYSD 培地にて選抜を行ない、URA3遺伝子脱落株を得た。上記の方法と同様にPCR法を用いてURA3遺伝子を脱落させたmnn4破壊株を確認した。 $\Delta mnn1::hisG$   $\Delta mnn4::hisG$ を含む本株をTIY11株とした。

糖鎖中のリン酸基の有無は、アルシアンブルー(alcian blue)で染め分けることができる。アルシアンブルーは正に荷電しており、負の荷電と結合する色素である。そこで、酵母細胞をpH3の緩衝液に懸濁して0.1%のアルシアンブルー8GX(Sigma製、code No. A3157)を加えると、糖鎖中にリン酸基をもつものだけが青く染まり、リン酸基をもたないものは白くなる。 $\Delta mnn4$ 破壊株は、細胞表層の糖鎖がほとんどリン酸基を持たないため、アルシアンブルーに染まらない。野生株、TIY3およびTIY11を栄養培地にて培養し、それぞれの細胞をアルシアンブルーにより染色した結果、TIY11のみ青く染まらないことを確認した。

## (3) $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1$ 栄養要求性三重変異株の作製とその性質

OCH1遺伝子は、酵母第7番染色体に位置し、OCH1遺伝子のDNA塩基配列は、

GenBankデータベースにD11095で登録されている (Nakayama et al., EMBO J., 11, 2511-2519 (1992))。すでに構築されているOCH1遺伝子の全長を含む pBL-OCH1 (Nakayama et al., EMBO J., 11, 2511-2519 (1992)) のOCH1遺伝子内部AatII-HpaI部位を切断し、平滑末端化したpNKY51より得たHUUカセットを挿入したpBL- $\Delta och1::HUU$  を作製した。本プラスミドを SalI および BamHI で切断することにより  $\Delta och1::HUU$  を含む領域を切り出し、TIY11を酢酸リチウム法で形質転換した。 $\Delta och1$ 破壊を含む株は低浸透圧感受性を示すため、形質転換後、0.3 M KClを含むSD-Ura培地のプレートにまいて、30℃で2日間培養し、形質転換体を得た。

形質転換体よりゲノムDNAを調製し、PCR法によりウラシルマーカが  $\Delta OCH1$ 領域の染色体に組込まれていることを確認し、TIY17株とした。

本株を、5-FOAと0.3 M KClを含むYSD 培地にて選抜を行ない、URA3遺伝子脱落株を得た。上記の方法と同様にPCR法を用いてURA3遺伝子を脱落させた  $och1$ 破壊株を確認した。 $\Delta mnn1::hisG$   $\Delta mnn4::hisG$   $\Delta och1::hisG$ を含む本株をTIY19株とした。

この栄養要求性三重変異株TIY19株は、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に平成11年7月27日付で受託番号 FERM BP-6802として国際寄託されている。

$och1$ 破壊を含む本TIY19株は、ハイマンノース型糖鎖を形成するためインベルターゼの移動度が、野生株、TIY3株、TIY11株に比べ早くなることが知られている。そこで、 $och1$ 破壊株の糖鎖長における効果を確認するため、それぞれ野生株、TIY3, TIY11, TIY19株より上記に示した方法でインベルターゼを検出した結果、野生株、TIY3, TIY11, TIY19の順に移動度が早くなっていることを確認した。

〔実施例2〕 哺乳類型糖鎖生産能を有する酵母変異株 ( $\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1 \Delta alg3$ 栄養要求性四重変異株) の作製とその性質

ALG3遺伝子は、酵母第2番染色体に位置し、ALG3遺伝子のDNA塩基配列は、GenBankデータベースにZ35844で登録されている (Feldmann et al., EMBO J.,

13, 5795-5809 (1994))。 ALG3 遺伝子の 5' 領域をプライマー I (GCGGCCGCGAGACCTGAATCTTCGACACGCAAGAAAAA : 配列番号 9) と J (GAATTCGCTTTCGAACAAAATCAAAAGGGGCATAAC : 配列番号 10) を用いて、また、3' 領域をプライマー K (GAATTCCTATCCACCAAACCTCACAAGCAAGCA : 配列番号 11) と L (GCGGCCGCGAGAGGGTGAACGGTGCTAACTCAGGATT : 配列番号 12) を用いて、それぞれ PCR で増幅した。これらの DNA 断片を HUH カセットを持つ pSP73-HUH の EcoRI 部位に組み込み、pSP73-alg3::HUH を作製した。本プラスミドを NotI 部位で切断することにより直鎖化し、TIY19 株を酢酸リチウム法を用いて形質転換した。形質転換後、SD-Ura 培地のプレートにまいて、30℃ で 2 日間培養し、形質転換体を得た。

形質転換体よりゲノム DNA を調製し、PCR 法によりウラシルマーカが ALG3 領域の染色体に組み込まれていることを確認し、YS134 株とした。

本株を、5-FOA を含有した SD 培地にて選抜を行ない、URA3 遺伝子脱落株を得た。上記の方法と同様に PCR 法を用いて URA3 遺伝子を脱落させた alg3 破壊株を確認した。 Δmnn1::hisG Δmnn4::hisG Δoch1::hisG Δalg3::hisG を含む本株を YS134-4A 株とした。

この栄養要求性四重変異株 YS134-4A 株は、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に平成 11 年 7 月 27 日付で受託番号 FERM BP-6801 として国際寄託されている。

alg3 破壊を含む本 YS134-4A 株は糖鎖長が短いため、インベルターゼの移動度が、野生株、TIY3 株、TIY11 株、TIY19 株に比べ早くなることが知られている。そこで、alg3 破壊株の糖鎖長における効果を確認するため、それぞれ野生株、TIY3 株、TIY11 株、TIY19 株、YS134-4A 株より実施例 1 (1) に示した方法でインベルターゼを検出した結果、野生株、TIY3 株、TIY11 株、TIY19 株、YS134-4A 株の順に移動度が早くなっていることを確認した。

〔実施例 3〕 Δmnn1Δmnn4Δoch1 栄養要求性三重変異株からの細胞表層マシナンタンパク質の分離とその含有糖鎖の構造解析

コンカナバリンAはC-3, C-4, C-6位の水酸基が未置換の $\alpha$ -D-Manを、2残基以上含む糖鎖に対して親和性を示すレクチンであり、これをカラムに固定することで、酵母細胞壁多糖であるグルカンやキチンなどとマンナンタンパク質を分離することができる。まず、TIY19株の菌体より細胞表層のマンナンタンパク質を分離した (Peat et al., J. Chem. Soc., 29 (1961))。

0.3 M KClを含むYPAD培地50 mlを500 ml容坂口フラスコに入れ、30℃で24時間培養し、菌体を遠心分離によって集め、10 mlの100 mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、オートクレーブ中で121℃、1時間加熱した。冷却後、遠心分離し、上清を取り、固形物は、もう一度10 mlの水を加えて同様に加熱、遠心分離し、上清を集めた。全抽出液を合わせて、3倍量のエタノール中に注加した。生じた白色の沈殿物を乾燥させた。これをコンカナバリンA (ConA) カラム用緩衝液 (0.15 M塩化ナトリウム、0.5 mM塩化カルシウムを含む0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2)) に溶解し、ConA-アガロースカラム (0.6 x 2 cm、ホーネンコーポレーション社製) に供し、ConAカラム用緩衝液で洗浄後、0.2 Mの $\alpha$ -メチルマンノシドを含むConAカラム用緩衝液で溶出を行なった。得られた画分を透析し、凍結乾燥を行なってマンナンタンパク質を得た。

次に得られたマンナンタンパク質に対し、酵素処理を施しAsn結合型糖鎖を切りだした。すなわち、凍結乾燥標品を100  $\mu$ lのN-グリコシダーゼF用緩衝液 (0.5% SDS, 0.35% 2-メルカプトエタノールを含む0.1 M Tris-HCl緩衝液 (pH8.0)) に溶解し、5分間煮沸処理をした。室温まで戻した後、50  $\mu$ lの7.5% Nonidet P-40、138  $\mu$ lのH<sub>2</sub>O、12  $\mu$ lのN-glycosidase F (ベーリンガー社製) を加え、37℃、16時間処理した。BioRad AG501-X8カラムで脱塩後、等量のフェノール：クロロホルム (1:1) を加え激しく振盪して、界面活性剤とタンパク質を除去し、糖鎖調製品とした。

得られた糖鎖を蛍光標識 (ピリジルアミノ化、PA化という) するため、以下の操作を行なった。糖鎖調製品を濃縮乾固後、40  $\mu$ lのカップリング試薬 (552 mgの2-アミノピリジンを200  $\mu$ lの酢酸に溶解した) を加え、密封し、90℃、60分処理した。室温まで戻した後、140  $\mu$ lの還元試薬 (200 mgのボラン・ジメチ

ルアミン複合体を50  $\mu$ l のH<sub>2</sub>Oと80  $\mu$ lの酢酸に溶解した)を加え、密封し、80°C、80分処理した。反応後、アンモニア水を200 ml加えた後、さらに等量になるようにフェノール：クロロホルム (1：1)を加え、激しく振盪してPA化オリゴ糖を含む水層を回収した。これを7回繰り返し、未反応の2-アミノピリジン除去した。上清について0.22  $\mu$ m のフィルターで濾過し、PA化オリゴ糖調製品とした。

アミドカラムを用いたHPLCでは、PA化オリゴ糖をその鎖長によって分離することが可能である。カラムはTSKGel Amide-80 (4.6 x 250 mm、東ソー製)を使用し、溶媒は、200 mM酢酸-トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの35：65の混合液 (A液)、200 mM酢酸-トリエチルアミン緩衝液 (pH7.0) とアセトニトリルとの50：50の混合液 (B液) を調製した。

予め溶媒Aを流速1.0 ml/minで流すことによりカラムを平衡化し、試料注入直後から溶媒Bの割合を25分かけて50%まで直線的に上昇させ、その後、溶媒Aと溶媒Bを50：50のまま5分間流し、PA化オリゴ糖を溶出した。その結果を図6に示す。 $\Delta och1 \Delta mnn1 \Delta mnn4$ 栄養要求性三重変異株であるTIY19株の生産するマンナンタンパク質の糖鎖は、アミドカラムでは主に1つのピークであった。このピークはMan<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA標品 (宝酒造製) の溶出位置と一致した。したがって、TIY19株の生産するマンナンタンパク質にはMan<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>のハイマンノース型糖鎖が付加していることが明らかとなった。

#### [実施例4] $\Delta och1 \Delta mnn1 \Delta mnn4$ 栄養要求性三重変異株への $\alpha$ -mannosidase I

##### 遺伝子の導入

より哺乳類型に近い糖鎖を酵母で生合成するには、その初発反応を司る  $\alpha$ -mannosidase I ( $\alpha$ -1,2-mannosidase) の遺伝子を栄養要求性三重変異株に導入し、発現させればよい。これによりハイマンノース型糖鎖がさらに短くなった、哺乳類混成型または哺乳類複合型の前駆体であるMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>糖鎖を生合成できる。

既に発現実績のある Aspergillus saitoi由来の  $\alpha$ -1,2-mannosidaseの小胞体型

発現プラスミドpGAMH1 (Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304 (1998)) を使い、TIY19株を酢酸リチウム法で形質転換した。コントロールとして、 $\alpha$ -1,2-mannosidase遺伝子を含まないベクターpG3だけで形質転換したものを用いた。形質転換後、SD-Trp (2%グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製)、トリプトファンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) ) 培地のプレートにまいて、30℃で2日間培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をTIY19pGAMH1 とした。

得られた形質転換体から実施例3と同様に糖鎖を調製、HPLCでの分析を行った。

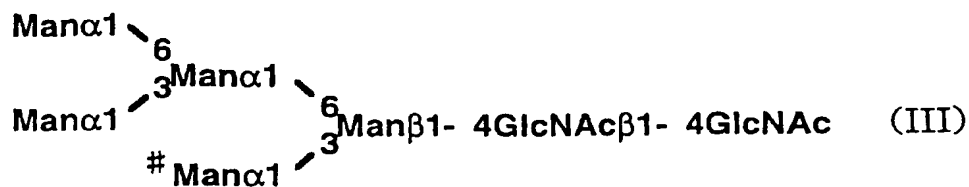
アミドカラムによる分析結果を図7に示した。コントロールのベクターのみのものでは、実施例3の結果と同様、主に1つのピークであり (図7, a)、Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA標品 (宝酒造製) の溶出位置と一致した。一方、 $\alpha$ -1,2-mannosidase遺伝子を含むTIY19pGAMH1 では、主に4つのピークが見られた (図7, b)。これらのピークは溶出の早い順にMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA、Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA、Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA、Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA標品と溶出位置が一致した。これらはヒト型のハイマンノース型糖鎖と呼ばれるものである。

次に溶出が最も早かったMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA画分を分取し、逆相カラムに供した。

逆相カラムを用いたHPLCでは、PA化オリゴ糖をその構造によって分離することが可能である。カラムはTSK Gel ODS-80T<sub>M</sub> (4.6 x 150 mm、東ソー製) を使用し、溶媒は、100 mM酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) (A液)、0.5% 1-ブタノールを含む100 mM酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) (B液) を調製した。

予め溶媒Aと溶媒Bを95:5で混合したものを流速1.2 ml/minで流すことによりカラムを平衡化し、試料注入直後から溶媒Bの割合を20分かけて50%まで直線的に上昇させ、PA化オリゴ糖を溶出した。その結果を図8に示す。分取した糖鎖画分は、逆相カラムでは主に1つのピークであり (図8, a)、このピークは下記式 (III) :





(式中、Man はマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。＃は、GnT-I 作用部位を示す。)

で表される構造を有するMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA標品（宝酒造製）の溶出位置と一致した（図8，b）。したがって、TIY19pGAMH1 株の生産するマンナンタンパク質には、混成型・複合型の前駆体であるMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>型の糖鎖が含まれていることが明らかとなった。

#### 〔実施例5〕 混成型糖鎖（GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>）標品の合成

まず混成型糖鎖（GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>）の生合成の確認検討のため、細胞外でGnT-Iの酵素反応を用い目的糖鎖の合成を行なった。GnT-Iはその基質特異性が非常に厳密であり、前記式（III）で示される糖鎖構造に対しては＃の位置のマンノース残基にのみβ-1,2 結合でGlcNAcを転移することが知られている。

ラットGnT-I遺伝子の酵母での発現は吉田らによって成功している（Yoshida et al., Glycobiology, 9, 53-58 (1999)）。この遺伝子をマルチコピープラスミドであるpG3のGAP-DHプロモーターの下流に接続した後、SmaI - NaeIで切断し、プロモーターとそれに続くGnT-IのORF、ターミネーターを含む領域を切り出した。次にこの断片をマルチコピープラスミドであるpYO354のSmaI 部位に導入した。このプラスミドをpYOG4と命名した。このプラスミドを用い、野生型酵母YPH500株を酢酸リチウム法で形質転換した。形質転換後、SD-Trp（2%グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製）、トリプトファンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物（20-400 mg/L））培地のプレートにまいて、30℃で2日間培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をYPH500/ pYOG4とした。

これを500 mlのSD-Trp（2%グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製）、トリプトファンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物（20-400 mg/L））溶液で液体培養し、集菌した。冷水で洗浄後、スフェロプ

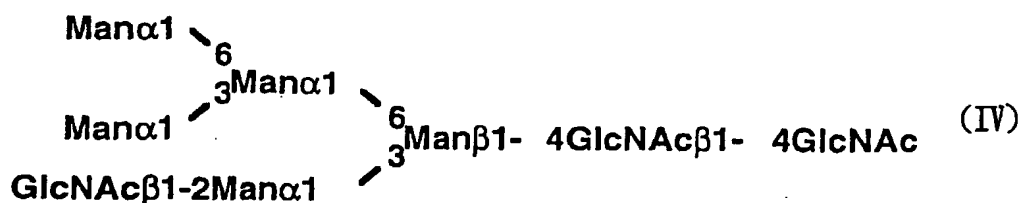
ラスト培地（1 Mソルビトールを含む50 mM リン酸カリウム (pH 7.5)）5.7 ml に懸濁し、2-メルカプトエタノール9  $\mu$ l と12 mgのZymolyase 100Tを300  $\mu$ l のスフェロプラスト培地に溶解し加え、30°C、45分間保温した。1 Mソルビトール15 mlを加え、遠心後、沈殿を再び1 Mソルビトール15 mlで洗浄、集菌した。この沈殿にlysis buffer（250 mMソルビトール、2  $\mu$ g/mlアンチパイン、2  $\mu$ g/mlキモスタチン、3  $\mu$ g/mlロイペプチン、3  $\mu$ g/mlペプスタチン、1 mMベンズアミジン、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM PMSFを含む10 mM トリエタノールアミン (pH 7.2)溶液）を4 ml加え、ホモジナイザーで細胞を破壊し、220 x gで遠心して上清を回収した。この上清をさらに100,000 x gで遠心し、その沈殿画分をlysis buffer 150  $\mu$ l に懸濁し、GnT-Iの酵素溶液とした。なお、本標品には他のGnT活性は検出されなかった。

次に目的糖鎖の合成を行なった。PAでラベルされたMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>糖鎖（宝酒造より購入）を受容体基質とし、これを200 pmol分チューブに分注した。蒸発乾固後、このチューブに上記で調製したGnT-I酵素溶液8.2  $\mu$ l、0.2 M MnCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l、GnT-I反応buffer（0.17 M MES (pH 6.0)、1.7% Triton X-100、0.34% Bovine Serum Albumin、8.47 mM AMP、1.69 mM UDP-GlcNAc、169 mM GlcNAc）9.8  $\mu$ lを加え、37°C、3時間反応させた。5分間煮沸して反応停止後、0.22  $\mu$ m のフィルターで濾過し、HPLCに供した。

カラムはTSKGel ODS-80T<sub>M</sub>（4.6 x 250 mm、東ソー製）を使用し、溶媒は、0.15% 1-ブタノールを含む100 mM酢酸アンモニウム緩衝液（pH 6.0）を用いた。予め溶媒を流速1.2 ml/minで流すことによりカラムを平衡化し、試料を注入し、PA化オリゴ糖を溶出した。その結果を図9に示す。反応物は、逆相カラムでは主に2つのピークであり、早く溶出されたピークはMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA標品（宝酒造製、前記式(III) に構造を示す）の溶出位置と一致した。よってこれは未反応の受容体基質であると考えられた。

一方、遅く溶出されたピークについてはこれを分取し、精製の後、TOF-MSによる質量分析を行なった。ThermoQuest社製LASERMAT2000を用い、マトリックスとして2.5%の2,5-dihydroxybenzoic acid、40% アセトニトリルを含む0.01%リン酸2ナトリウムを用い、解析を行なった。その結果、前述のピーク画

分の質量は予想される分子質量 ( $m/z=1521$  ( $H^+$ );  $m/z=1541$  ( $Na^+$ )) とに相当した。GnT-Iの厳密な基質特異性から、得られた糖鎖は下記式 (IV) :



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。)

に示す構造を有する目的の混成型糖鎖GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>9</sub>であると考えられた。

〔実施例 6〕 Δ och1 Δ mnn1 Δ mnn4栄養要求性三重変異株への α-mannosidase I 遺伝子と GnT-I 遺伝子の導入

混成型糖鎖を酵母で生合成するには、実施例 4 で作製した酵母株にさらに GnT-I 遺伝子を導入し、発現させればよい。これにより哺乳類混成型 GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>9</sub>糖鎖を生合成できる。

実施例4で使用した Aspergillus saitoi 由来の  $\alpha$ -1,2-mannosidase の小胞体型発現プラスミド pGAMH1 (Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304 (1998)) より、SmaI-NaeI で切断して、プロモーターとそれに続く  $\alpha$ -1,2-mannosidase の ORF、ターミネーターを含む領域を切りだした。次にこの断片を pYOG4 の SmaI 部位に導入した。このプラスミドを pYOMG4 と命名した。このプラスミドを用い、TIY19 株を酢酸リチウム法で形質転換した。コントロールとして、pYO354 だけで形質転換したものを用いた。形質転換後、SD-Trp (2% グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 社製)、トリプトファンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L)) 培地のプレートにまいて、30℃ で2日間培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体を TIY19 pYOMG4 とした。

この $\alpha$ -mannosidase I遺伝子とGnT-I遺伝子が導入され、混成型糖鎖を産生する栄養要求性三重変異株TIY19pYOMG4株は、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成11年7月2日付で受託番号

FERM BP-6775として国際寄託されている。

得られた形質転換体から実施例 3 と同様に糖鎖を調製、HPLCでの分析を行った。

アミドカラムによる分析結果を図 10 に示した。コントロールのベクターのものでは、実施例 3 の結果と同様、主に 1 つのピークであり、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  標品（宝酒造製）の溶出位置と一致した（図 10, A）。 $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子と GnT-I 遺伝子を含む TIY19pYOMG4 では、主に 5 つのピークが見られた（図 10, B）。これらのピークのうち、4 つ（図 10, B ; peak a, c, d, e）は  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  標品と溶出位置が一致した。これらはヒト型のハイマンノース型糖鎖と呼ばれるものである。さらに  $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子のみを導入したときには見られなかった新たなピーク（図 10, B ; peak b）が出現した。このピークの溶出位置は実施例 5 で作製した混成型  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  糖鎖標準品の溶出位置と一致した。さらにこのピークを分取し、実施例 3 と同様に逆相カラムに供した。カラム、溶媒や条件は実施例 5 に示した方法で行なった。分取した糖鎖画分は、逆相カラムでは主に 1 つのピークであり（図 11）、このピークは再び  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  標品の溶出位置と一致した。したがって、TIY19pYOMG4 株の生産するマンナンタンパク質には、混成型である  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  型の糖鎖が含まれていることが明らかとなった。

#### 〔実施例 7〕 ヒト肝臓 $\alpha$ -mannosidase II の酵母での発現

$\alpha$ -mannosidase II は、ゴルジ体内で混成型糖鎖を一本鎖複合型糖鎖に変換する酵素である。

ヒト肝臓  $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子配列は、GenBank データベースに U31520 で登録されている（Misago et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 11766-11770 (1995)）。Clontech 社の Human Liver Marathon-Ready cDNA をテンプレートにして、 $\alpha$ -mannosidase II の N 末端側領域をコードする部分をプライマー M (CGCCGCCGAGCTCTAAAAAATGAAGTTAAGCCGCC : 配列番号 13) と N (ATCCCACTTGTGAAAGGT : 配列番号 14) を用いて、中央をコードする部

分をプライマーO (GAAGACTCACGGAGGAAGTT : 配列番号 15) とP (ATGGCGGTATATGTGCTCGA : 配列番号 16) を用いて、C末端側領域をコードする部分をプライマーQ (CGCAGTTTGGGATACAGCAA : 配列番号 17) とプライマーR (ATTATTATTAGCGGCCGCCCCTCAACTGGATTCTG : 配列番号 18) を用いて、それぞれPCRで増幅した。得られたDNA断片をpCRScriptのSrfI部位に導入し、配列を確認後、BglII部位でつなぎ換えてすべての領域をコードする正しい配列になるようにした。このプラスミドをpCRMAN2と命名した。

目的のタンパク質の発現確認のため、 $\alpha$ -mannosidase II遺伝子の3'末端に、インフルエンザウイルスヘマグルチニンエピトープをコードする30 bpからなるHA tagを3回反復するように結合させる遺伝子を作製し、ベクターを構築した。すなわち、配列S (配列番号 19) からなる二本鎖DNAを化学合成し、発現用プラスミドのpYEX-BXのBamHIとEcoRI部位の間に挿入した。このプラスミドをpYEX-BX-3HAと命名した。次にpCRMAN2からBamHIとEcoRIで $\alpha$ -mannosidase IIをコードする部分を切り出し、pYEX-BX-3HAのSacIとNotI部位の間に挿入した。このプラスミドをpYEMAN2-HAと命名した。

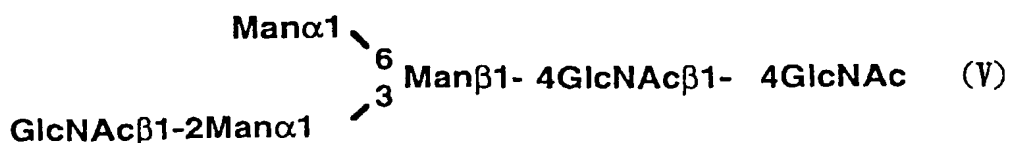
次に酵母での発現量を向上させるため、 $\alpha$ -mannosidase IIの膜貫通領域をコードする部分を酵母の $\alpha$ -1,6-mannosyltransferaseをコードする遺伝子(OCH1)の膜貫通領域部分と置換した。すなわち、配列T (配列番号 20) からなる二本鎖DNAを化学合成し、pBluescriptのSacIとEcoRI部位間に挿入した。このプラスミドをpBOCH1と命名した。一方、pYMAN2-HAをテンプレートとして、 $\alpha$ -mannosidase IIの触媒領域をコードする部分の一部をプライマーU (TTAGACTACCCATGGAACCCGCGCCGCGAGGGCTCCTTC : 配列番号 21) とプライマーV (CAGGAGAACTTTGGTTCGAAAAAGCTTTGACTTCTT : 配列番号 22) を用いて増幅した。この配列を確認後、NcoIとHindIIIで切断し、pBOCH1のNcoIとHindIII部位間に挿入した。次にこのプラスミドからSacIとPstIで断片を切り出し、pYEMAN2-HAのSacIとPstI間と置換した。このプラスミドをpYEOM2-HAと命名した。

宿主として*S. cerevisiae*野生型酵母YPH500を用い、形質転換は酢酸リチウム法を用いて行なった。コントロールとしてpYEX-BX-3HAを用いた。形質転換

後、SD-Ura (2%グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製)、ウラシルを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L)) 培地のプレートにまいて、30℃で2日間培養し、形質転換体を得た。

形質転換された酵母は30℃でOD660=0.8までSD-Ura培地で培養後、硫酸銅を適当量添加し、さらに2時間培養した。集菌後、SDSサンプルバッファー中でガラスビーズにより細胞を破碎し、その細胞抽出液を用いてウエスタンブロット解析を行なった。ウエスタンブロット解析は一次抗体としてラット抗HA抗体を、二次抗体として抗ラットIgG抗体ペルオキシダーゼ複合体を用い、検出はSuper Signal Ultraを基質としてX線フィルムに露光することで行なった。その結果、コントロールではシグナルが全く見られないのに対し、pYEOM2-HAで形質転換した細胞抽出液では、分子量約140000の位置にシグナルが確認された（図12）。

次に実施例 5 で作製した混成型糖鎖（式(IV)に構造を示す）を基質にして、 $\alpha$ -mannosidase II の酵素活性を測定した。混成型糖鎖（式(IV)に構造を示す）100pmol をサンプルチューブ内で乾燥させた後、同チューブに 0.2 M  $\text{MnCl}_2$ 、1 M  $\text{GlcNAc}$ 、1 M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.6）を 2  $\mu\text{l}$  ずつ、 $\text{H}_2\text{O}$  を 8  $\mu\text{l}$  加えた後、細胞抽出液を 8  $\mu\text{l}$  加えて酵素反応を開始した。37°C で一晩保温後、煮沸して反応を停止し、遠心により不溶性画分を除いたのち、HPLC にて解析した。なお HPLC 分析の条件は、実施例 5 に従った。その結果、 $\alpha$ -mannosidase II を発現させた酵母の細胞抽出液を酵素源とした場合、コントロールと比較し 40 分のピークが明らかに増加していた（図 13、B）。この 40 分のピークは、PA-糖鎖標準品（宝酒造 PA-Sugar Chain 022）の酵素消化物から得られた下記式（V）で表される一本鎖複合型糖鎖（Oguri et al., J. Biol. Chem., 272, 22721-22727 (1997)）の溶出位置と一致していたことから、 $\alpha$ -mannosidase II の活性であることを確認した。



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。)

〔実施例 8〕 二本鎖複合型糖鎖を生産するのに必要な遺伝子を導入した栄養要求性三重変異株の作製

ヒト GnT-II の酵母での発現は吉田らによって報告されている (Yoshida S. et al., Abstracts of the meeting on Yeast Cell Biology, p. 279, Cold Spring Harbor Laboratory (1997))。この発現用ベクター pSY114-GnT-II よりプロモーターを含む GnT-II 遺伝子領域を XbaI で切りだし、pBluescript SK の XbaI 部位に挿入した。このプラスミドを pBlueGT2 と命名した。次に実施例 6 で示したプラスミド pYOG4 よりプロモーターを含む GnT-I 遺伝子領域を BamHI, XbaI で切り出し、pBlueGT2 の BamHI, XbaI 部位に挿入した。このプラスミドから BssHII で目的断片を切り出した後、DNA T4 polymerase で末端を平滑化した後、ADE2 をマーカーとして有する pASZ10 プラスミド (Stotz & Linder, Gene, 95, 91-98 (1990)) の SmaI 部位に断片を挿入した。このプラスミドを pASZGN12 と命名した。pASZGN12 を HpaI で直鎖状にし、実施例 1 で作製した栄養要求性三重変異株 TIY19 株の形質転換を酢酸リチウム法で行なった。形質転換後、0.3 M KCl を含む SD-Ade (2% グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 社製)、アデニンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) 培地のプレートにまいて、30℃ で 2 日間培養し、形質転換体を得た。形質転換体よりゲノム DNA を調製し、PCR 法により GnT-I および GnT-II 遺伝子が ADE2 領域の染色体に組込まれていることを確認し、YCY22 株とした。YCY22 株の細胞抽出液を用いてそれぞれの酵素活性を測定し、GnT-I および GnT-II の発現を確認した。

一方、ヒト  $\beta$ -1,4-GalT の酵母での発現は、前述の吉田らによって報告されている (Yoshida S. et al., Abstracts of the meeting on Yeast Cell Biology, p. 279, Cold Spring Harbor Laboratory (1997))。この発現用ベクター pGalT13C よりプロモーターを含む  $\beta$ -1,4-GalT 遺伝子領域を SalI, XhoI で切りだし、pRS403 の SalI, XhoI 部位に挿入した。このプラスミドを pRSGAL1 と命名した。またヒト UDP-Gal Transporter (Ugt2p) の酵母での発現は貝沼らによって報告されてい

る (Kainuma et al., Glycobiology, 9, 133-141 (1999))。この遺伝子 (UGT2) の発現用プラスミド YEp352-GAP-UGT2 より、プロモーターを含む遺伝子領域を BamHI で切り出し、pRSGAL1 の BamHI 部位に挿入した。このプラスミドを pRSGATP1 と命名した。pRSGATP1 を NdeI で直鎖状にし、YCY22 株の形質転換を酢酸リチウム法で行なった。形質転換後、0.3 M KCl を含む SD-His (2% グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 社製)、ヒスチジンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) 培地のプレートにまいて、30℃ で 2 日間培養し、形質転換体を得た。形質転換体よりゲノム DNA を調製し、PCR 法により  $\beta$ -1,4-GalT および UGT2 遺伝子が HIS3 領域の染色体に組込まれていることを確認し、YCY42 株とした。YCY42 株の細胞抽出液を用いてそれぞれの酵素活性を測定し、 $\beta$ -1,4-GalT および Ugt2p の発現を確認した。

次に、ヒト肝臓  $\alpha$ -mannosidase II の発現用ベクター pYEOM2-HA より、SacI, SphI で HA-tag を含む遺伝子断片を切り出し、DNA T4 polymerase で末端を平滑化した。この断片を pAUR123 の SmaI 部位に挿入した。プロモーターに正しい方向でつながれていることを確認後、プロモーターを含む  $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子領域を BamHI で切り出し、pRS406 の BamHI 部位に挿入した。このプラスミドを NdeI で直鎖状にし、前記 YCY42 株の形質転換を酢酸リチウム法で行なった。形質転換後、0.3M KCl を含む SD-Ura (2% グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 社製)、ウラシルを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) 培地のプレートにまいて、30℃ で 2 日間培養し、形質転換体を得た。形質転換体よりゲノム DNA を調製し、PCR 法により遺伝子が URA3 領域の染色体に組込まれていることを確認し、YCY52 株とした。YCY52 株の細胞抽出液を用いて酵素活性を測定し、 $\alpha$ -mannosidase II の発現を確認した。

実施例 4 で示した  $\alpha$ -1,2-mannosidase の発現用ベクター pGAMH1 より NaeI と SmaI で、プロモーター領域を含む  $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子断片を切り出し、pYO325 ベクターの SmaI 部位に挿入した。このプラスミドを pYOM5 と命名した。さらに、ゴルジ体へ基質を供給するのに必要な UDP-GlcNAc Transporter 遺伝子



の導入を行なった。ヒトUDP-GlcNAc Transporter遺伝子の酵母での発現は石田らによって報告されている (Ishida et al., J. Biochem., 1261, 68-77 (1999))。この発現用ベクターをテンプレートにして、プライマーW (AGAGCGGCCGCAAAATGTTGCGCCAACCTAA : 配列番号 23) とプライマーX (TTTTGTCGACTAGACGCGTGAAGCATGCCC : 配列番号 24) でPCR法によりUDP-GlcNAc Transporter遺伝子領域を増幅した。この配列を確認後、NotIとSalIで切断し、pG3-NのNotIとSalI部位間と置換した。次にこのプラスミドからNaeIとSmaIで、プロモーター領域を含むUDP-GlcNAc Transporter遺伝子断片を切り出し、pYOM5のSmaI部位に挿入した。このプラスミドをpYOMR5と命名した。このプラスミドを用いて前記YCY52株の形質転換を酢酸リチウム法で行なった。形質転換後、0.3 M KClを含むSD-Leu (2%グルコース、0.67 % YeastNitrogen Base w/o amino acids (Difco社製)、ロイシンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) 培地のプレートにまいて、30℃で2日間培養し、形質転換体を得た。この形質転換体をYCY73株とした。YCY73株の細胞抽出液を用いて酵素活性を測定し、 $\alpha$ -1,2-mannosidaseとUDP-GlcNAc Transporterの発現を確認した。

また、msdSとhUGTrel2をインテグレーションするためのプラスミドを作製した。PGAMHをSma I、Nae Iで切断してGAPプロモーターとmsdS配列を切り出し、pRS404のPvu II部位に挿入した。このプラスミドをmsdS-pRS404と命名した。hUGTrel2がGAPプロモーターの下流に挿入されているプラスミド、hUGTrel2-pG3をSma I、Nae Iで切断してGAPプロモーターとhUGTrel2配列を切り出し、msdS-pRS404のPst I部位に挿入した。このプラスミドをHM-pRS404と命名した。HM-pRS404のTRP1内のBstX Iで切断し、YCY42株を酢酸リチウム法を用いて形質転換した。形質転換体を5mlのYPAD+0.3M KClで、30℃で2日間培養し、PCR法により、msdSとhUGTrel2がTRP1の染色体に組み込まれていることを確認した。また細胞抽出液を用いて酵素活性を測定し、両株の $\alpha$ -1,2-mannosidase及びUDP-GlcNAcトランスポーターの発現を確認した。YCY42株にmsdSとhUGTrel2をインテグレーションした株をTIY63株とした。

さらに、ヒト肝臓 $\alpha$ -mannosidase IIの発現用ベクターpYEOM2-HAより、

**SacI**, **SphI**でHA-tagを含む遺伝子断片を切り出し、DNA T4 polymeraseで末端を平滑化した。この断片をpAUR123の**SmaI**部位に挿入した。プロモーターに正しい方向でつながれていることを確認後、プロモーターを含む  $\alpha$ -mannosidase II 遺伝子領域を**BamHI**で切り出し、pRS406の**BamHI**部位に挿入した。このプラスミドを**NdeI**で直鎖状にし、TIY63株の形質転換を酢酸リチウム法で行なった。形質転換後、0.3 M KClを含むSD-Ura (2% グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製)、ウラシルを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) 培地のプレートにまいて、30°Cで2日間培養し、形質転換体を得た。形質転換体よりゲノムDNAを調製し、PCR法により遺伝子が**URA3**領域の染色体に組込まれていることを確認し、MSY3株とした。MSY3株の細胞抽出液を用いて酵素活性を測定し、 $\alpha$ -mannosidase IIの発現を確認した。

〔実施例 9〕 二本鎖複合型糖鎖を生産するのに必要な遺伝子を導入した栄養要求性四重変異株の作製

まず、実施例 8 で作製したプラスミドpASZGN12を**HpaI**で直鎖状にし、実施例 2 で作製した栄養要求性四重変異株YS134-4A株の形質転換を酢酸リチウム法で行なった。形質転換後、0.3 M KClを含むSD-Ade (2%グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製)、アデニンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) 培地のプレートにまいて、30°Cで2日間培養し、形質転換体を得た。形質転換体よりゲノムDNAを調製し、PCR法によりGnT-IおよびGnT-II遺伝子がADE2領域の染色体に組込まれていることを確認し、YCY122株とした。YCY122株の細胞抽出液を用いてそれぞれの酵素活性を測定し、GnT-IおよびGnT-IIの発現を確認した。

次に、実施例 8 で作製したプラスミドpRSGATP1を**NdeI**で直鎖状にし、YCY122株の形質転換を酢酸リチウム法で行なった。形質転換後、0.3 M KClを含むSD-His (2%グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製)、ヒスチジンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) 培地のプレートにまいて、30°Cで2日間培養し、形質転換体を得た。形

質転換体よりゲノムDNAを調製し、PCR法により $\beta$ -1,4-GalTおよびUGT2遺伝子がHIS3領域の染色体に組込まれていることを確認し、YCY142株とした。YCY142株の細胞抽出液を用いてそれぞれの酵素活性を測定し、 $\beta$ -1,4-GalTおよびUgt2pの発現を確認した。

さらに、実施例8で示したプラスミドpYOMR5を用いてYCY142株の形質転換を酢酸リチウム法で行なった。形質転換後、0.3 M KClを含むSD-Leu (2% グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製)、ロイシンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) 培地のプレートにまいて、30℃で2日間培養し、形質転換体を得た。この形質転換体をYCY163株とした。YCY163株の細胞抽出液を用いて酵素活性を測定し、 $\alpha$ -1,2-mannosidaseとUDP-GlcNAc Transporterの発現を確認した。

このYCY163株について、酵母の細胞表層のマンナンタンパク質の糖鎖構造の変化を見るために、レクチン染色性の評価を行なった。コンカナバリンAは特定のマンノース3残基を含む、ハイマンノース型、混成型、二本鎖複合型糖鎖などと結合することが知られているが、その親和性は混成型、二本鎖複合型糖鎖と比べハイマンノース型糖鎖の方が高いことが知られている。そこで、Texas-red標識コンカナバリンA溶液を集菌した酵母細胞と混合し、時々攪拌しながら4℃、2時間放置した。PBSで洗浄後、10 mM  $\alpha$ -methyl mannosideを含むPBSで洗浄し、蛍光顕微鏡下で観察を行なった。その結果、YS134-4A株では洗浄後も細胞の周りが蛍光染色されていたが、YCY163株では細胞の周囲にみられた蛍光が明らかに減少していることを確認した。このことからYCY163株ではハイマンノース型の糖鎖が減少し、複合型糖鎖が生成していることが示唆された。

〔実施例10〕 哺乳類型糖鎖生産能を有する酵母変異株でのヒト線維芽細胞成長因子 (FGF) の生産と糖鎖構造の改変

FGF6-1キメラ遺伝子 (secFGF (N35)) は生命工学工業技術研究所の米田敦子氏より供与頂いた (Yoneda et al., BioTechniques, 27, 576-590 (1999))。SecFGF(N35)/pBSをSma I、Nae Iで切断してFGFを切り出し、pGEM2- $\alpha$ 36のHindIII部位に挿入した。このプラスミドをpFGF $\alpha$ 23と命名した。pFGF $\alpha$ 23

をEcoR Iで切断し、prepro  $\alpha$ -factorとFGF領域を切り出し、pUC119プラスミドのEcoR I部位に挿入した。このプラスミドをFGF-pUC119と命名した。 $\alpha$ -factor の EAEA 配列を除くために、プライマー Y (CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC : 配列番号 25) とプライマー Z (ATGGGCCGGCTCTTTTATCCAAAGATAC : 配列番号 26) を用いてPCRで増幅した。このDNA断片をpUC18のEcoR I部位に組み込み、pAF02プラスミドを作製した。pFGF01をNae I、Sma Iで切断してFGFを切り出し、pAF02のNae I、Sma I部位に挿入した。このプラスミドをpAF03と命名した。pAF03をEcoR Iで切断してprepro  $\alpha$ -factorとFGF領域を切り出し、YEp352GAPプラスミドのGAPプロモーターの下流に組み込んだプラスミドpAFF2を作製した。pAFF2をAat II、Hpa Iで切断し、2  $\mu$ m領域を切り出し、酵母インテグレーション用プラスミドpAFF3を構築した。次に、pAFF3をApaI I、AccI Iで切断してGAPプロモーターとFGFの配列を切り出し、LEU2マーカーをもつプラスミドpYO325のPvu II部位に挿入した。さらにプラスミドの2  $\mu$ m領域をSpe Iで切断して除いた。このプラスミドをpAFF9と命名した。pAFF9内にあるEcoR Vで切断して直鎖化し、酵母 (TIY19株、YCY42株) を酢酸リチウム法を用いて形質転換した。形質転換後、SD-Leu (2% グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製)、ロイシンを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L)) 培地のプレートにまいて、30°Cで2日間培養し、それぞれ形質転換体を得た。

それらの形質転換体を5mlのYPAD+0.3M KClで、30°Cで3日間培養し、培養上清液に50  $\mu$ lベッドのヘパリンセファロース懸濁液 (ファルマシア社製) を加え、4°Cで一晩振とうしてFGFをヘパリンセファロースに吸着させた。その後、遠心にてヘパリンセファロースを回収し、SDSサンプルバッファーで煮沸後、上清をSDS-PAGEに供した。抗FGF抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、FGFが発現していることを確認した。さらに、PCR法により、FGFがLEU2の染色体に組み込まれていることを確認し、TIY19株にFGFをインテグレーションした株をTIY48株、YCY42株にFGFをインテグレーションした株をTIY49株とした。

さらにタンパク質の安定的かつ効率的な発現を行なうため、msdSをインテグレーションするためのプラスミドを作製した。msdSがGAPプロモーターの下流に挿入されているプラスミドpGAMHをEcoR Iで切断し、2  $\mu$ m領域を除いたプラスミドを作製した。このプラスミドをpImsdSと命名した。pImsdSのTRP1内のXba Iで切断し、TIY48 ( $\Delta$  mnn1::hisG  $\Delta$  mnn4::hisG  $\Delta$  och1::hisG FGF::LEU2)、TIY49 ( $\Delta$  mnn1::hisG  $\Delta$  mnn4::hisG  $\Delta$  och1::hisG FGF::LEU2 ade2::[GnT-I & GnT-II] his3::[ $\beta$ -1.4-GalT & UGT2])を酢酸リチウム法を用いて形質転換した。得られた形質転換体を5 mlのYPAD+0.3 M KClで、30°Cで3日間培養し、培養液に50  $\mu$ lのヘパリンセファロース（ファルマシア製）を加え、4°Cで一晩振とうしてFGFをヘパリンセファロースに吸着させた。その後、ヘパリンセファロースを回収し、FGFの抗体でウエスタンブロッティングを行い、msdSが発現していることを確認した。さらに、PCR法により、msdSがTRP1の染色体に組み込まれていることを確認した。TIY48株にmsdSをインテグレーションした株をTIY53株、TIY49株にmsdSをインテグレーションした株をTIY54株とした。

次に、msdSとhUGTrel2をインテグレーションするためのプラスミドを作製した。PGAMHをSma I、Nae Iで切断してGAPプロモーターとmsdS配列を切り出し、pRS404のPvu II部位に挿入した。このプラスミドをmsdS-pRS404と命名した。hUGTrel2がGAPプロモーターの下流に挿入されているプラスミド、hUGTrel2-pG3をSma I、Nae Iで切断してGAPプロモーターとhUGTrel2配列を切り出し、msdS-pRS404のPst I部位に挿入した。このプラスミドをHM-pRS404と命名した。HM-pRS404のTRP1内のBstX Iで切断し、TIY48株、TIY49株を酢酸リチウム法を用いて形質転換した。形質転換体を5mlのYPAD+0.3M KClで、30°Cで3日間培養し、培養上清液に50  $\mu$ lベッドのヘパリンセファロース懸濁液（ファルマシア製）を加え、4°Cで一晩振とうしてFGFをヘパリンセファロースに吸着させた。その後、遠心にてヘパリンセファロースを回収し、SDSサンプルバッファーで煮沸後、上清をSDS-PAGEに供した。抗FGF抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、FGFが発現していることを確認した。さらに、PCR法により、msdSとhUGTrel2がTRP1の染色体に組み

込まれていることを確認した。また細胞抽出液を用いて酵素活性を測定し、両株の $\alpha$ -1,2-mannosidase及びUDP-GlcNAcトランスポーターの発現を確認した。TIY48株にmsdSとhUGTrel2をインテグレーションした株をTIY59株、TIY49株にmsdSとhUGTrel2をインテグレーションした株をTIY60株とした。

糖鎖の調製のため、FGFをLEU2の染色体上にインテグレーションしたTIY48株とTIY53株を使用して、3 Lの培養液からFGFを精製した。3 LのYPAD+0.3 M KClで30℃、3日間培養後、遠心して細胞を除いた培養液に2 mlのヘパリンセファロースを加え、4℃で一晩振とうしてFGFをヘパリンセファロースに吸着させた。ヘパリンセファロースを回収し、カラムにつめ、PBS+0.01% CHAPS、PBS+2.5 M NaCl+0.01% CHAPSを溶媒として、塩濃度の上昇によりFGFをヘパリンセファロースから溶出させた。

精製したFGF約150  $\mu$ gを逆相カラムにかけることにより、脱塩した。カラムは $\mu$ RPC C2/C18 PC3.2/3カラム（ファルマシア社製）を使用し0.1% トリフルオロ酢酸と0.1% トリフルオロ酢酸 - 60% アセトニトリルを溶媒として、逆相カラムからの溶出を行なった。

カラムから溶出したサンプルを乾燥させてヒドラジン分解を行った。真空状態で2 mlのヒドラジンを加え、110℃で60分間処理した。その後、室温まで冷却し、N-アセチル化を行った。250  $\mu$ lの0.2M酢酸アンモニウムと25  $\mu$ lの無水酢酸を加えよく攪拌し、30分間室温で放置した。さらに、250  $\mu$ lの0.2M酢酸アンモニウムと25  $\mu$ lの無水酢酸を加えよく攪拌し、30分間室温で放置した。反応液を濃縮乾固し、糖鎖調整品とした。

得られた糖鎖を蛍光標識（ピリジルアミノ化）するため、以下の操作を行った。糖鎖調整品を濃縮乾固後、20  $\mu$ lのカップリング試薬（300 mgの2-アミノピリジンを100  $\mu$ lの酢酸に溶解した）を加え、密封し、90℃、60分間処理した。その後、20  $\mu$ lの還元試薬（10 mgのボラン・ジメチルアミン複合体を50  $\mu$ lの酢酸に溶解した）を加え、密封し、80℃、60分間処理した。反応後、20  $\mu$ lのトリエチルアミン-メタノールを添加しよく攪拌した後、さらに40  $\mu$ lのトルエンを加えよく攪拌して、60℃、10分間、窒素気流下濃縮乾固した。その後、反応液に、20  $\mu$ lのメタノールを加えよく攪拌した後、40  $\mu$ lのトルエンを加えよく

攪拌して、60℃、10分間、窒素気流下濃縮乾固した。これを三回繰り返して、残渣に50  $\mu$ lのトルエンを加え、60℃、10分間、窒素気流下濃縮乾固した。反応後、HW-40ゲル濾過カラム処理を行い、未反応の2-アミノピリジンを除去した。

アミノカラムを用いたHPLCにより糖鎖構造解析を行った。カラムはAsahipak NH2P-50 (4.6 mm $\times$ 250 mm)を使用し、溶媒は、200 mM酢酸-トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.3) とアセトニトリルとの7:3の混合液 (A液)、200 mM酢酸-トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.3) とアセトニトリルとの2:8の混合液 (B液) を調整した。

予め溶媒Aを流速1.0 ml/minで流すことによりカラムを平衡化し、試料注入直後から溶媒Bの割合を50分かけて100%まで直線的に上昇させ、その後、溶媒Bの割合を100%のまま20分間流し、PA化オリゴ糖を溶出した。その分析結果を図14に示した。TIY48由来のものでは、実施例2の結果と同様、主に1つのピークであり (図14、上段)、Man8GlcNAc2-PA標品 (宝酒造製) の溶出位置と一致した。一方、 $\alpha$ -1,2-mannosidase 遺伝子を含むTIY53株では、主に1つのピークが見られた (図14、下段)。このピークはMan5GlcNAc2-PA標品と溶出位置が一致した。したがって、TIY53株で発現させたヒト糖タンパク質であるFGFは、ほぼ100%混成型・複合型の前駆体であるMan5GlcNAc2型糖鎖を有することが明らかとなった。

さらに、ヒト肝臓  $\alpha$ -mannosidase IIの発現用ベクターpYEOM2-HAより、SacI, SphIでHA-tagを含む遺伝子断片を切り出し、DNA T4 polymeraseで末端を平滑化した。この断片をpAUR123のSmaI部位に挿入した。プロモーターに正しい方向でつながれていることを確認後、プロモーターを含む $\alpha$ -mannosidase II遺伝子領域をBamHIで切り出し、pRS406のBamHI部位に挿入した。このプラスミドをNdeIで直鎖状にし、TIY60株の形質転換を酢酸リチウム法で行なった。形質転換後、0.3 M KClを含むSD-Ura (2% グルコース、0.67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco社製)、ウラシルを除く核酸塩基およびアミノ酸混合物 (20-400 mg/L) 培地のプレートにまいて、30℃で2日間培養し、形質転換体を得た。形質転換体よりゲノムDNAを調製し、PCR法により遺伝子がURA3領域の染色体に組込まれていることを確認し、MSY1株とした。MSY1

株の細胞抽出液を用いて酵素活性を測定し、 $\alpha$ -mannosidase IIの発現を確認した。

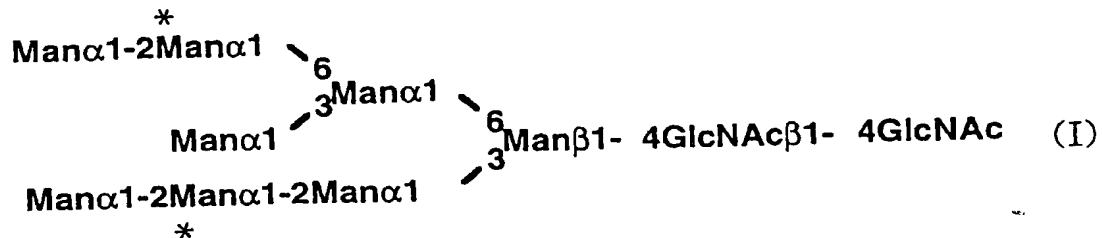
#### 産業上の利用可能性

本発明により新規に育種した栄養要求性三重変異株、栄養要求性四重変異株によれば、ヒトなど哺乳類細胞の生産するハイマンノース型と同一の中性糖鎖、あるいは同一の中性糖鎖を有する糖タンパク質を多量かつ純度よく生産することができる。また、当該変異株に哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を導入することにより、ハイマンノース型、ハイブリッド型、複合型等の哺乳類型糖鎖、あるいは哺乳類型糖鎖を有するタンパク質を効率的に生産することができる。



## 請 求 の 範 囲

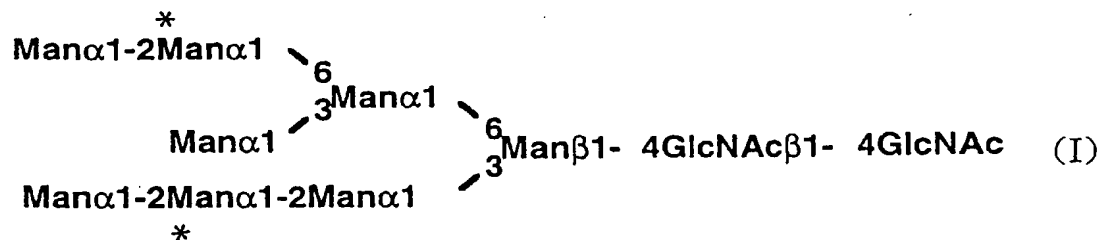
1. och1変異、mnn1変異、mnn4変異の変異形質と、少なくとも4個以上の栄養要求性変異形質を持つことを特徴とし、下記式 (I):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。\*はリン酸化可能部位を示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質生産能を有する酵母変異株。

2. 栄養要求性を相補する遺伝子を最終的に導入することなく、OCH1遺伝子を破壊したoch1変異 ( $\Delta\text{och1}$ )、MNN1遺伝子を破壊したmnn1変異 ( $\Delta\text{mnn1}$ )、MNN4遺伝子を破壊したmnn4変異 ( $\Delta\text{mnn4}$ ) の変異形質と、少なくとも1個以上の栄養要求性変異形質を持つことを特徴とし、下記式 (I):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。\*はリン酸化可能部位を示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質生産能を有する酵母変異株。

3. 栄養要求性変異形質が、ura3変異、his3変異、leu2変異、ade2変異、trp1

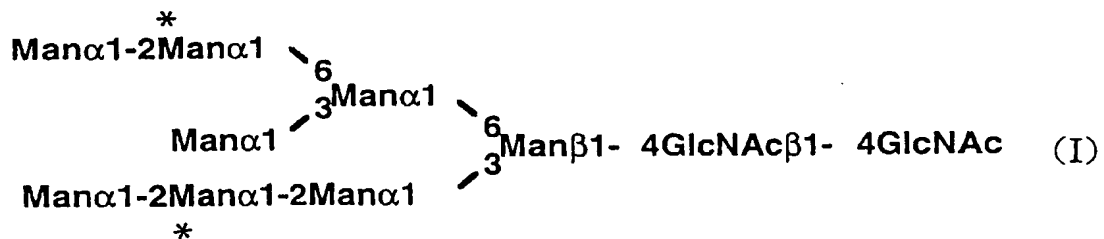
変異、can1変異から選ばれる、請求項 1 または 2 に記載の酵母変異株。

4. サッカロミセス (Saccharomyces)属に属する酵母である、請求項 3 に記載の酵母変異株。

5. サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) に属する酵母である、請求項 4 に記載の酵母変異株。

6. サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) TIY19 株である、請求項 5 に記載の酵母変異株。

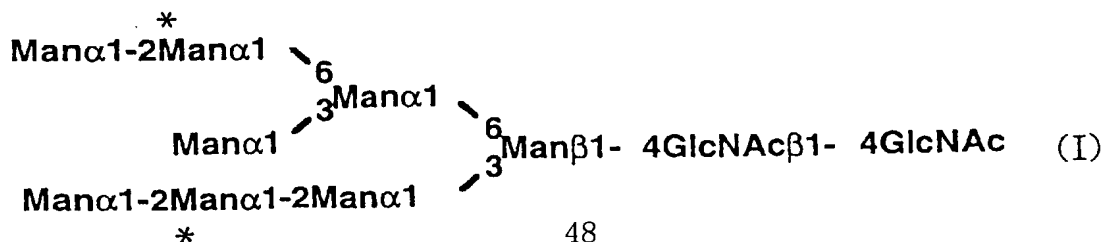
7. 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に下記式 (I):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。＊はリン酸化可能部位を示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取し、採取した糖タンパク質より該オリゴ糖鎖を回収することを特徴とする、オリゴ糖鎖の製造法。

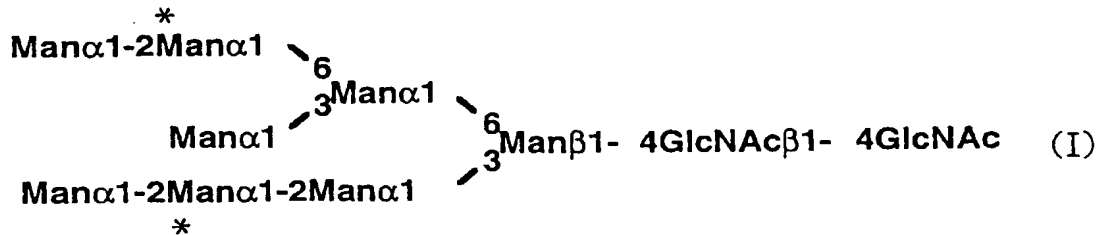
8. 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に下記式 (I):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。＊はリン酸化可能部位を示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

9. 哺乳類由来のアスパラギン結合型糖タンパク質をコードする遺伝子を含む組換えプラスミドにて形質転換させた請求項1～6のいずれか1項に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に下記式 (I):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。＊はリン酸化可能部位を示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

10. och1変異、mnn1変異、mnn4変異の変異形質を持つ酵母変異株に、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を、少なくとも二つ以上導入した酵母変異株。

11. 請求項1～6のいずれか1項に記載の酵母変異株に、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を、少なくとも一つ以上導入した酵母変異株。

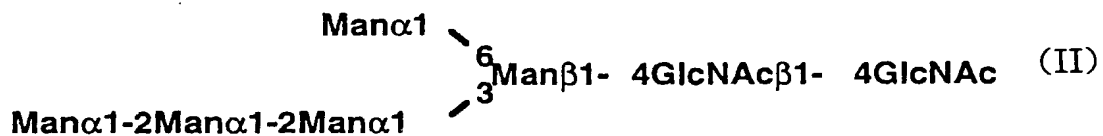
12. 請求項10または11に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取し、採取した糖タンパク質より該オリゴ糖鎖

を回収することを特徴とする、オリゴ糖鎖の製造法。

13. 請求項10または11に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

14. 哺乳類由来のアスパラギン結合型糖タンパク質をコードする遺伝子を含む組換えプラスミドにて形質転換させた請求項10または11に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

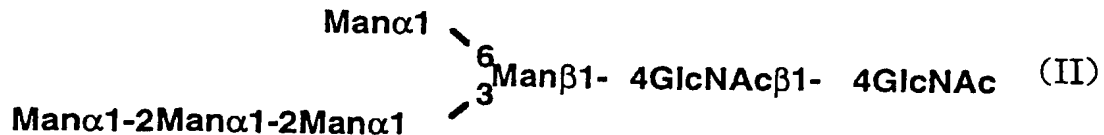
15. och1変異、mnn1変異、mnn4変異、alg3変異の変異形質と、少なくとも5個以上の栄養要求性変異形質を持つことを特徴とし、下記式 (II):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質生産能を有する酵母変異株。

16. 栄養要求性を相補する遺伝子を最終的に導入することなく、OCH1遺伝子を破壊したoch1変異 ( $\Delta\text{och1}$ )、MNN1遺伝子を破壊したmnn1変異 ( $\Delta\text{mnn1}$ )、MNN4遺伝子を破壊したmnn4変異 ( $\Delta\text{mnn4}$ )、ALG3遺伝子を破壊したalg3変異 ( $\Delta\text{alg3}$ ) の変異形質と、少なくとも1個以上の栄養要求性変異形質を持つことを特徴とし、下記式 (II):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質生産能を有する酵母変異株。

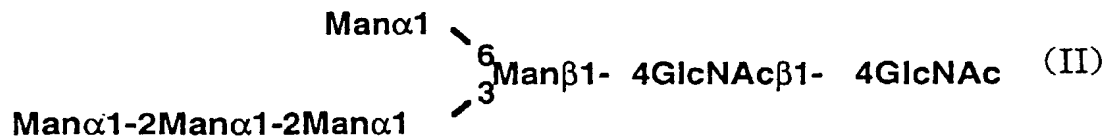
17. 栄養要求性変異形質が ura3変異, his3変異, leu2変異, ade2変異, trp1変異, can1変異から選ばれる、請求項15または16に記載の酵母変異株。

18. サッカロミセス (Saccharomyces)属に属する酵母である、請求項17に記載の酵母変異株。

19. サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) に属する酵母である、請求項18に記載の酵母変異株。

20. サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) YS134-4A株である、請求項19に記載の酵母変異株。

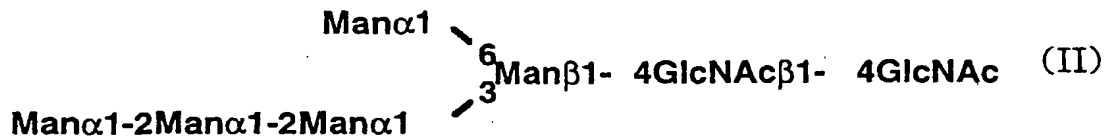
21. 請求項15～20のいずれか1項に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に下記式 (II):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取し、採取した糖タンパク質より該オリゴ糖鎖を回収することを特徴とする、オリゴ糖鎖の製造法。

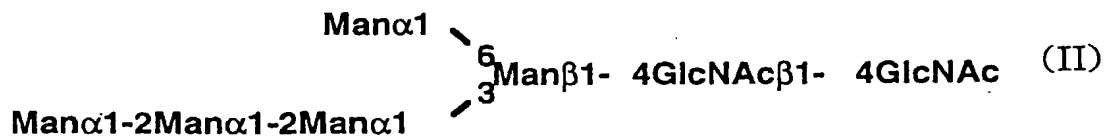
22. 請求項15～20のいずれか1項に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に下記式 (II):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

23. 哺乳類由来のアスパラギン結合型糖タンパク質をコードする遺伝子を含む組換えプラスミドにて形質転換させた請求項15～20のいずれか1項に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中に下記式 (II):



(式中、Manはマンノース、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを示す。)

で表されるオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

24. och1変異、mnn1変異、mnn4変異、alg3変異の変異形質を持つ酵母変異株に、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を、少なくとも二つ以上導入した酵母変異株。

25. 請求項15～20のいずれか1項に記載の酵母変異株に、哺乳類型糖鎖の

生合成系遺伝子を、少なくとも一つ以上導入した酵母変異株。

26. 請求項24または25に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取し、採取した糖タンパク質より該オリゴ糖鎖を回収することを特徴とする、オリゴ糖鎖の製造法。

27. 請求項24または25に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

28. 哺乳類由来のアスパラギン結合型糖タンパク質をコードする遺伝子を含む組換えプラスミドにて形質転換させた請求項24または25に記載の酵母変異株を培地に培養し、培養物中にオリゴ糖鎖をアスパラギン結合型糖鎖として含有する糖タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該糖タンパク質を採取することを特徴とする、糖タンパク質の製造法。

29.  $\alpha$ -マンノシダーゼII遺伝子が導入され、 $\alpha$ -マンノシダーゼII活性を有する酵母株。

30. 請求項29に記載の酵母株を培地に培養し、培養物中に生成蓄積された $\alpha$ -マンノシダーゼIIを採取することを特徴とする、 $\alpha$ -マンノシダーゼIIの製造法。

図 1

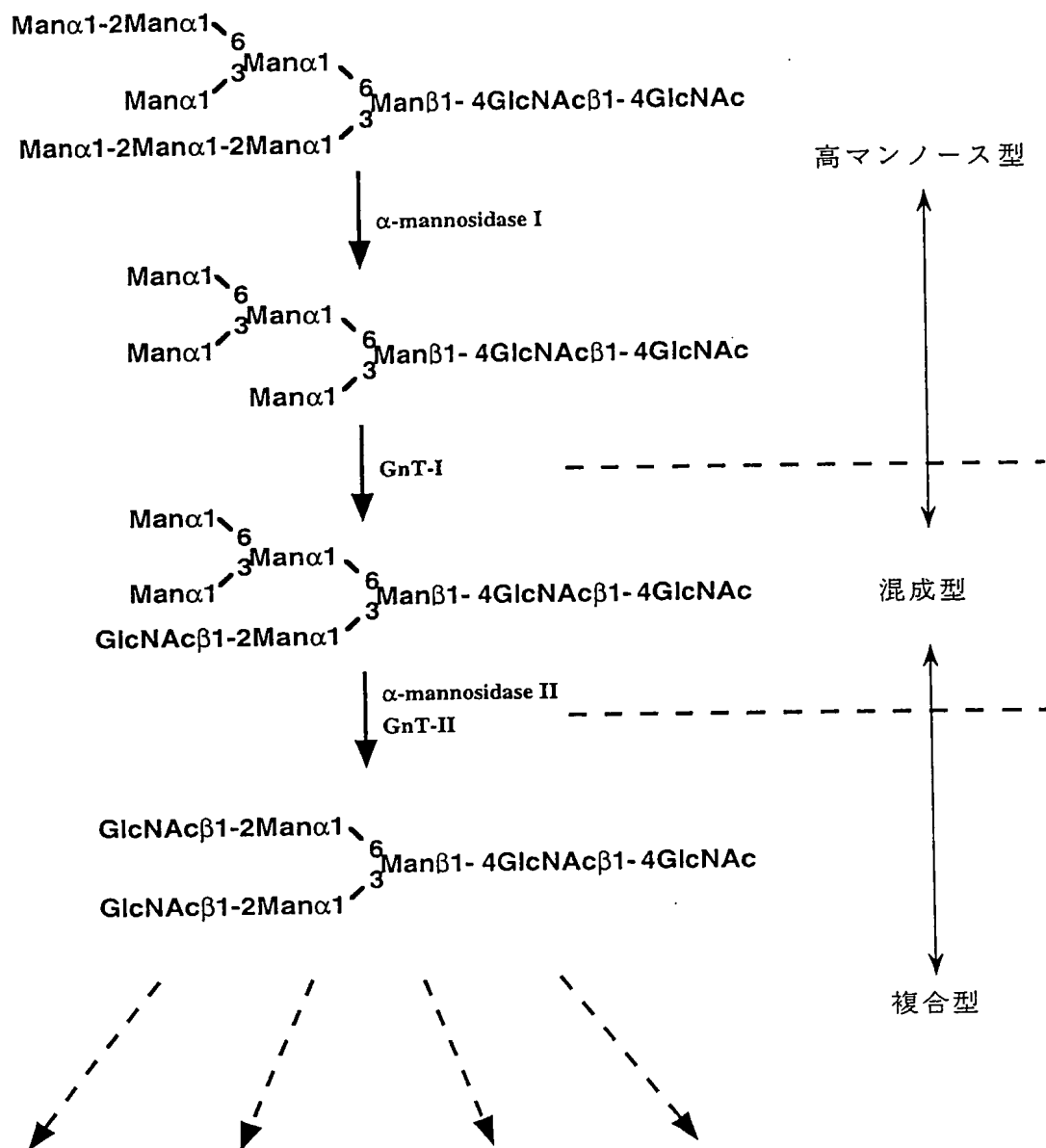
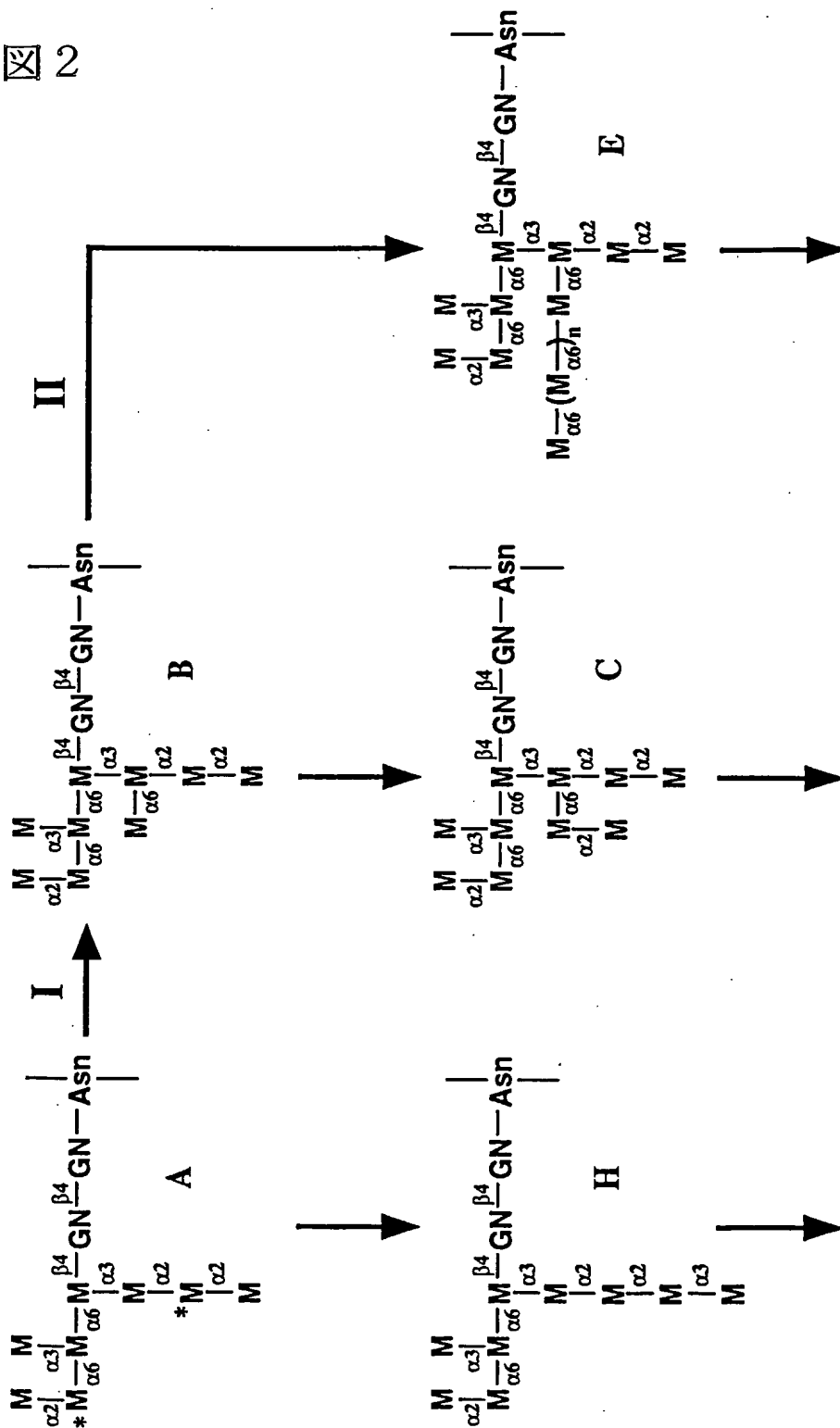




图 2



\*:リン酸化可能部位

**n : 50-100**

**m : 10-25**

图 3

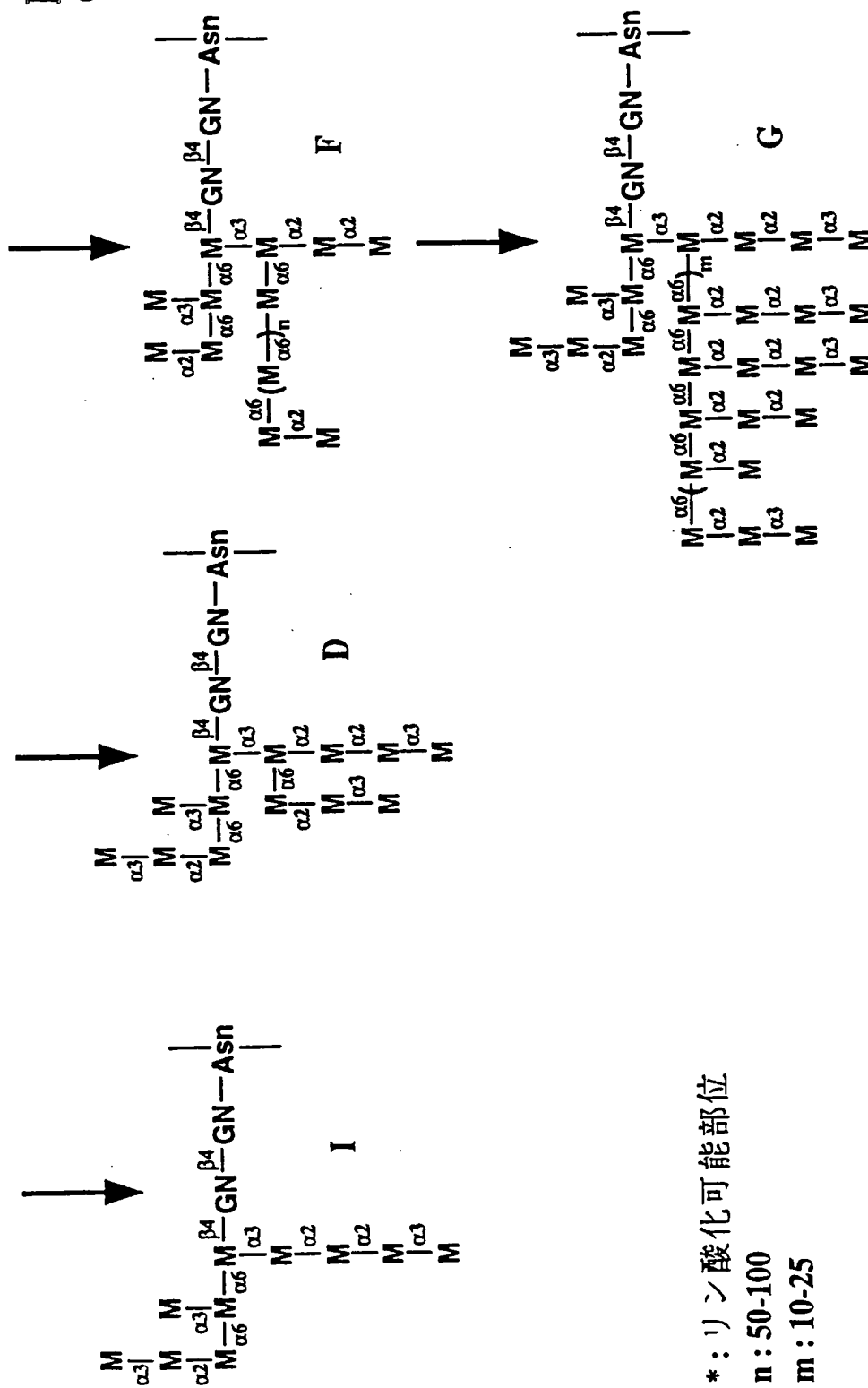


図 4

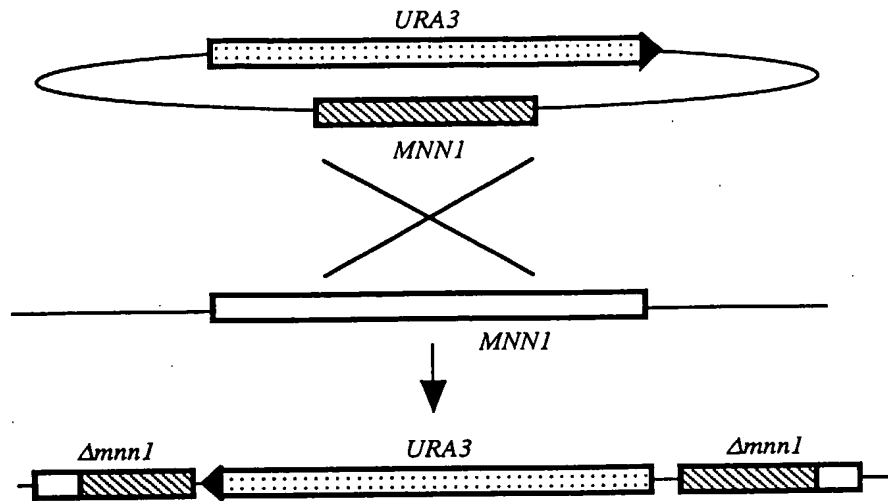


図 5

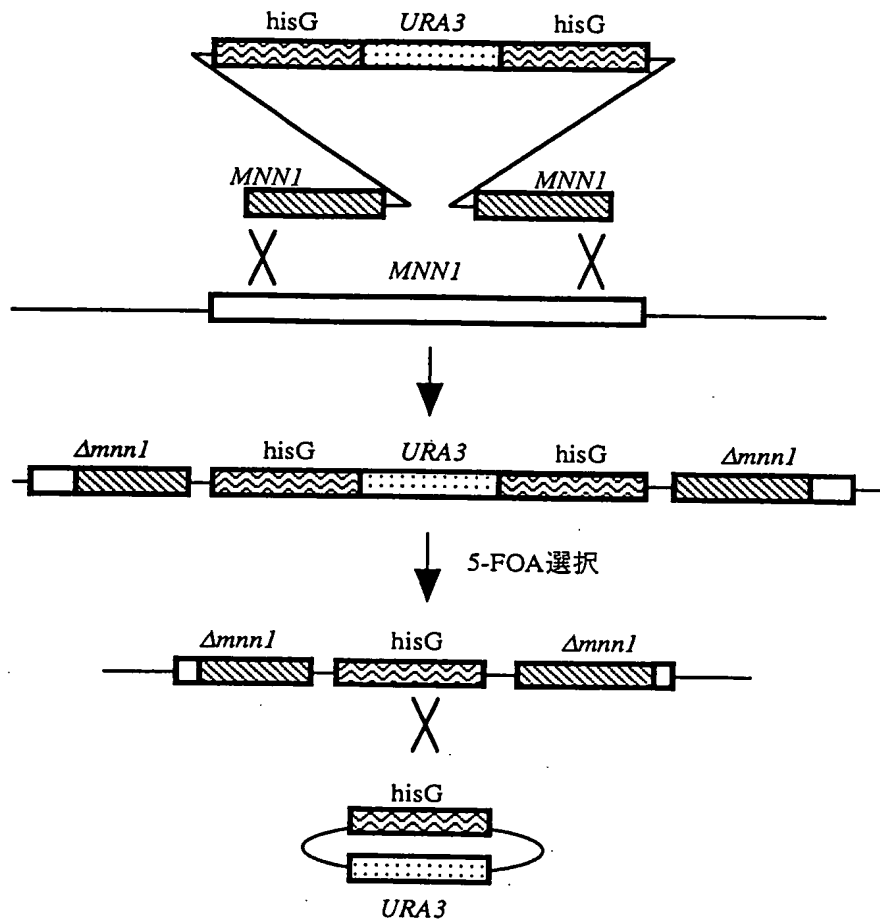


図 6

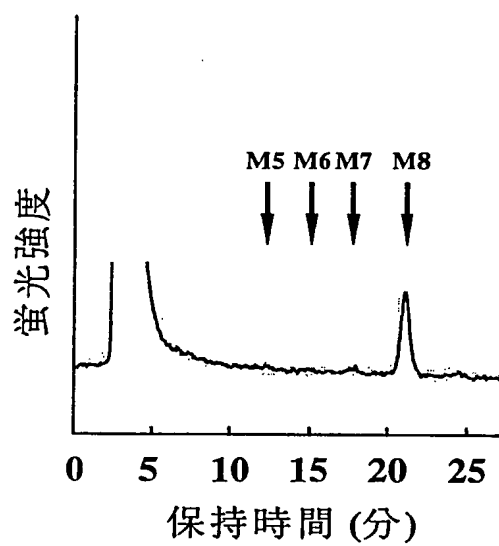


図 7

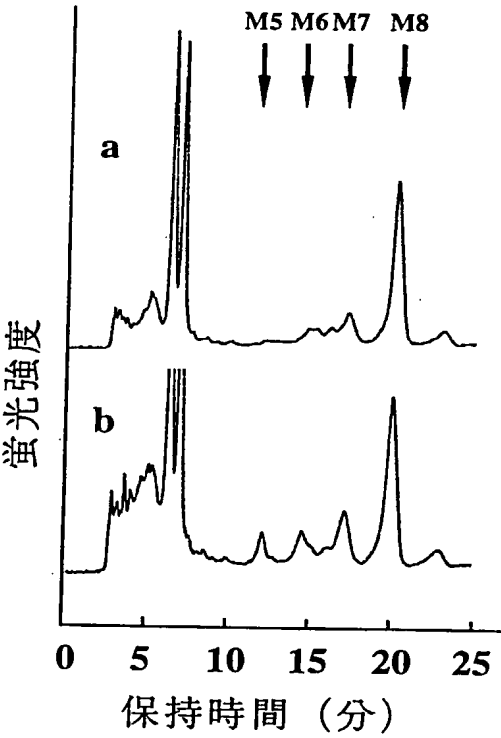


図 8

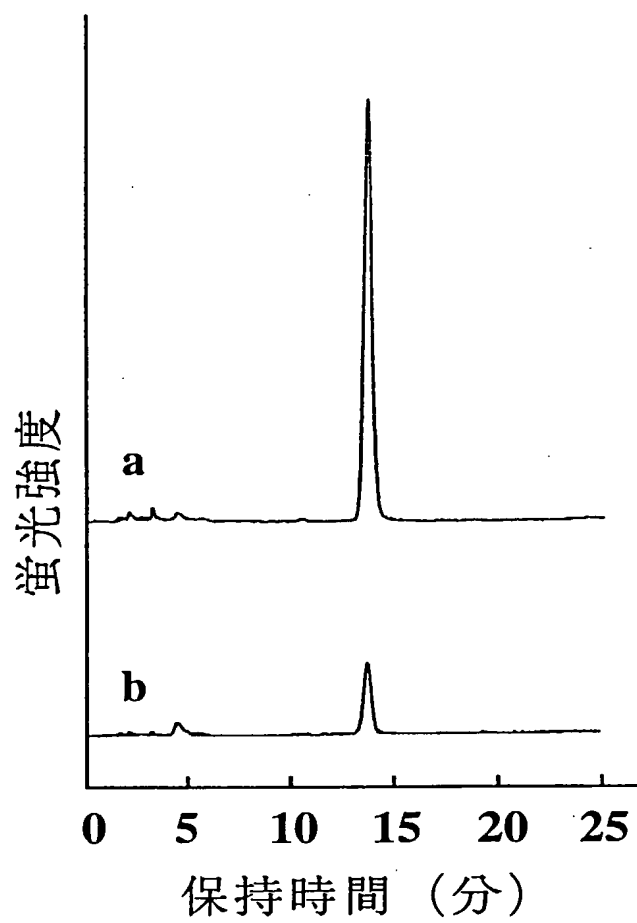


図 9

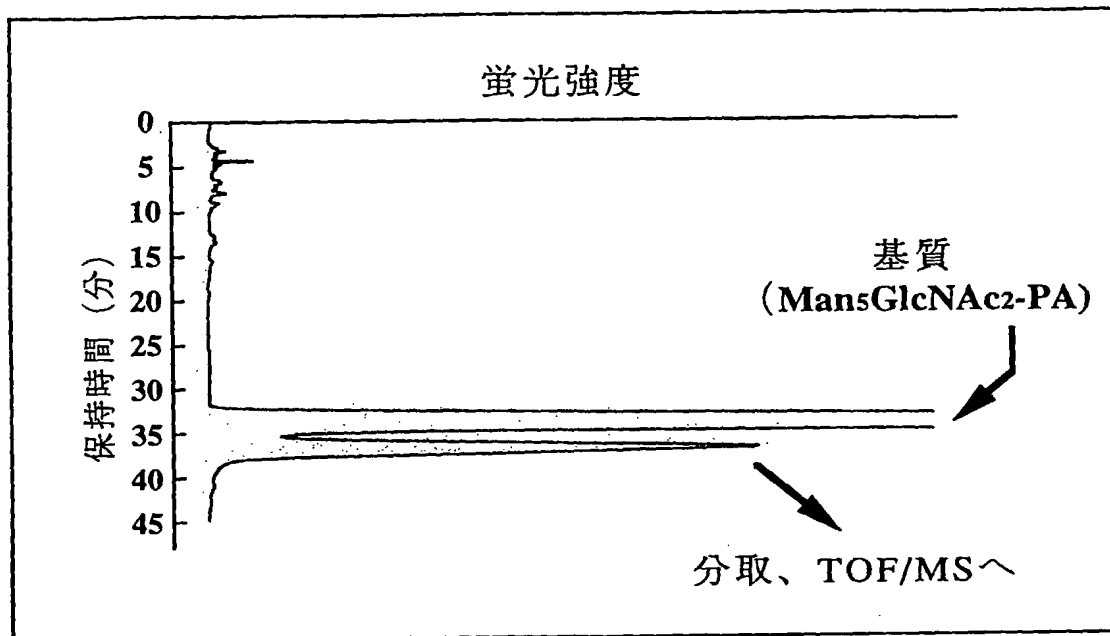




図 10

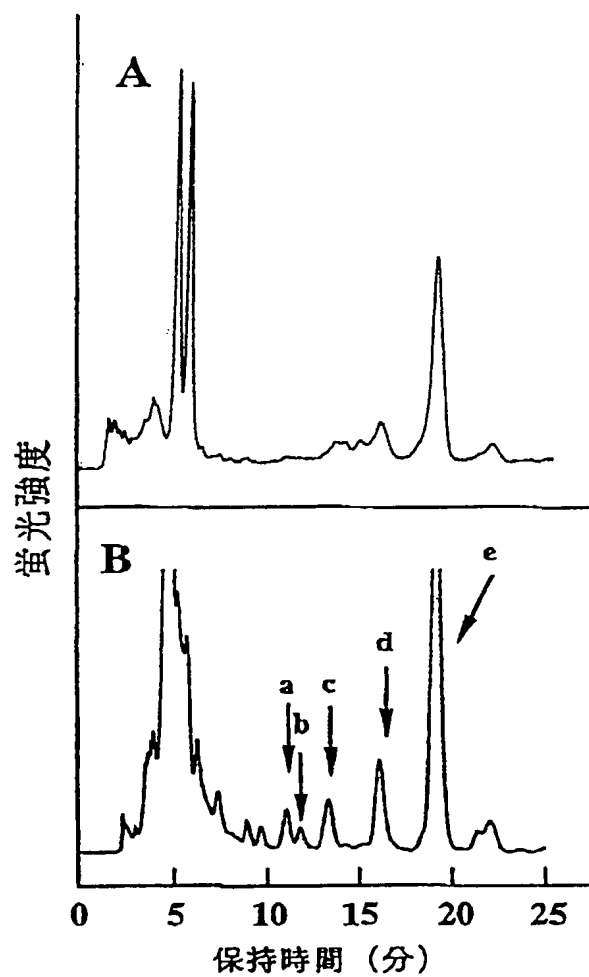


図 1 1

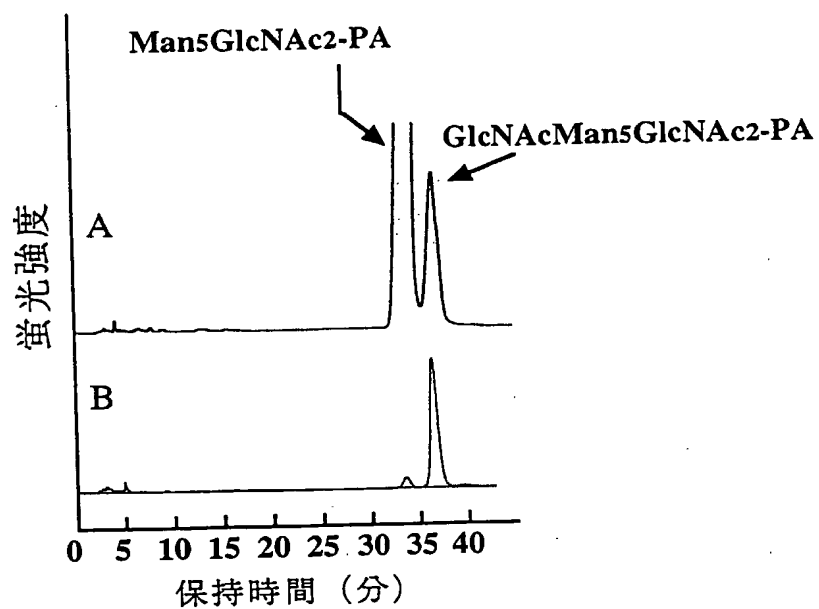


図 1 2

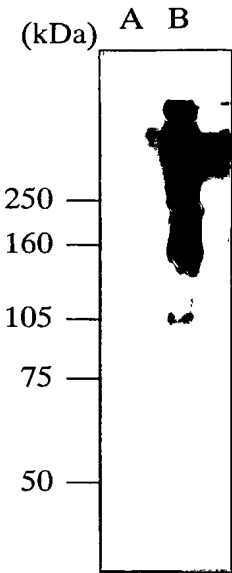


図 1 3

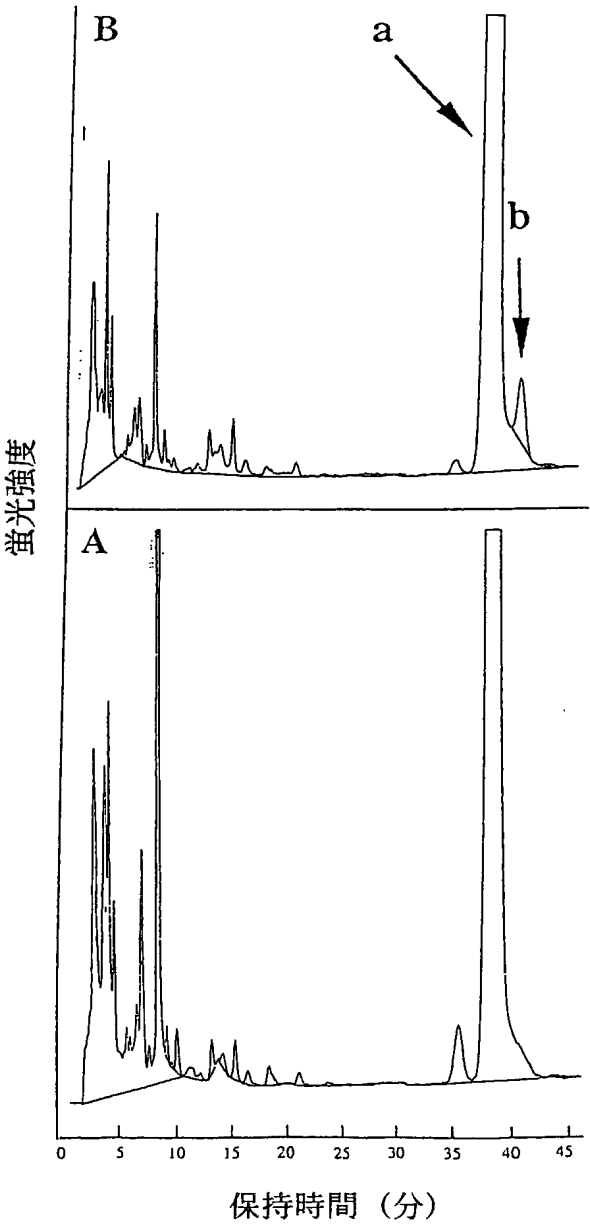
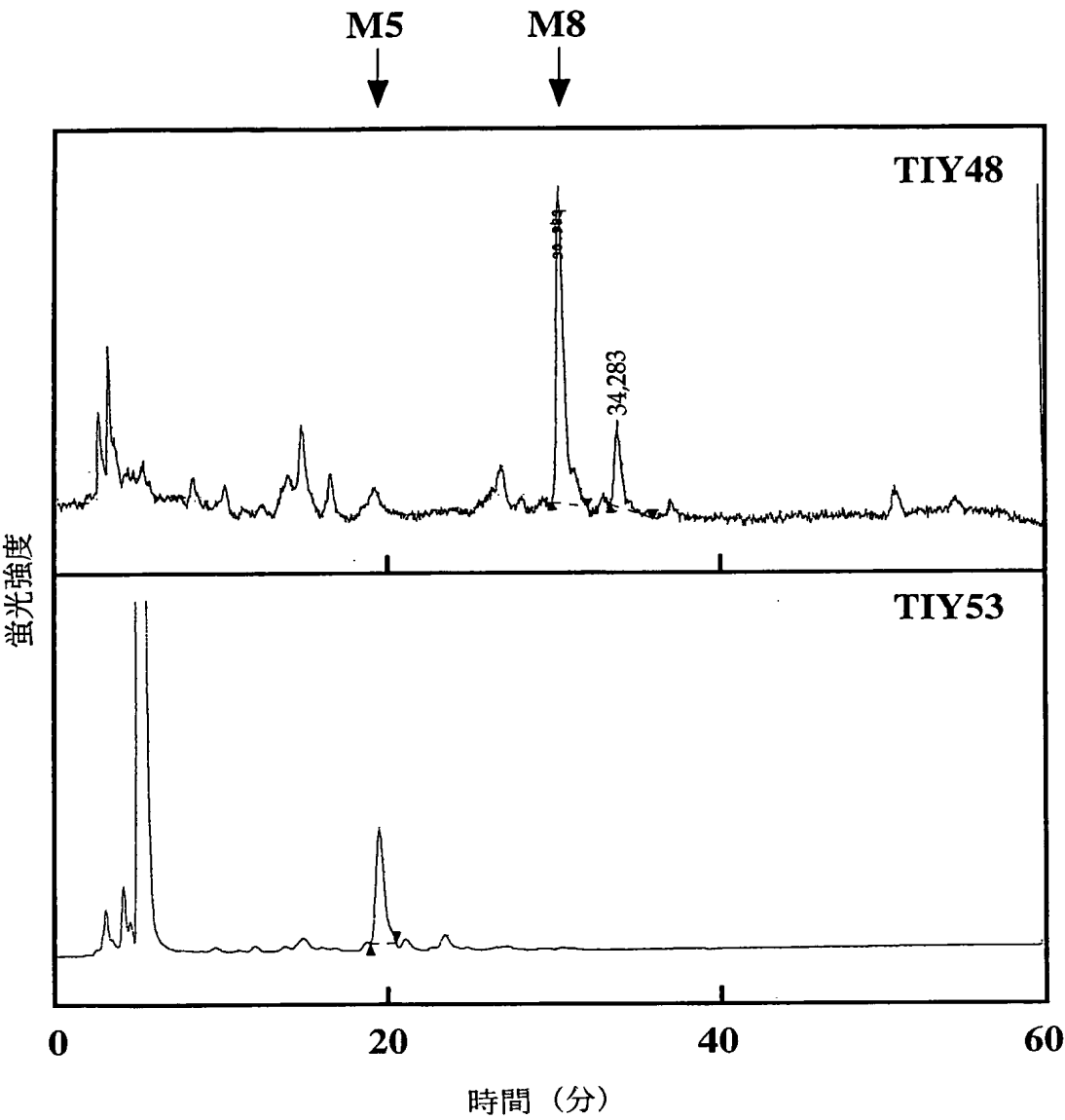


図 1 4



## 配列表

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Novel yeast mutant strain and method for preparing glycoprotein  
with mammalian-typed sugar chains

&lt;130&gt; PH-1034-PCT

&lt;160&gt; 26

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

&lt;400&gt; 1

GGATCCGAAG AAAACCTAAT ACATTGAAGT

30

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

GCATGCCCTT TGGTTTAATA TAAATCTCCG GAGTGC 36

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

GCATGCTACA TAACTCCAAT CAGCAGCAAA TATGTC 36

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

GCGGCCGCGT GTTCTGTTCG GGTAACGTTT AAACCAAT 38

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

AGATGCATAC TAGTGGGCCC ATTGTGATTG GAAT 34

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

CCCCCGAATT CGTGTGAAGG AATAGTGACG 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 30

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA



<400> 7

CCCCCGAATT CAAGTCGGAG AACCTGACTG 30

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

ATGGGCCCAC TAGTATGCAT CTCGCGTGGC ATGG 34

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

GCGGCCGCGA GACCTGAATC TTCGACACGC AAGAAAAA 38

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

GAATTCGCTT TCGAACAAAA TCAAAGGGG CATAAC 36

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

GAATTCCTAT CCACCAAAC CACAAGCAAG CA 32

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 12

GCGGCCGCCG AGAGGGTGAA CGGTGCTAAC TCAGGATT 38

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 13

CGCCGCCGAG CTCTAAAAAA ATGAAGTTAA GCCGCC 36

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 14

ATCCCACCAC TTTGAAAGGT 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 15

GAAGACTCAC GGAGGAAGTT 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 16

ATGGCGGTAT ATGTGCTCGA 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 17

CGCAGTTTGG GATACAGCAA 20

<210> 18

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400>18

ATTATTATTA GCGGCCGCCC CTCAACTGGA TTCG 34

<210> 19

<211> 162

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 19

GGATCCGAGC TCCACCGCGG TGGCGGCCGC ATGTTTTACC CATACGATGT TCCTGACTAT 60  
GCGGGCTATC CCTATGACGT CCCGGACTAT GCAGGATATC CATATGACGT TCCAGATTAC 120  
GCAGCTACTA GTGGGCATGC TTCACGCGTC TAGTGAGAAT TC 162

<210> 20

<211> 176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 20

GAGCTCAAAA AGAAAGCAAG TAAAAGAAAG AAGAGATCAT GTCTAGGAAG TTGTCCCACC 60  
TGATCGCTAC AAGGAAATCA AAAACAATAG TCGTAACCGT ACTTCTTATT TATTCTTTGT 120  
TGACATTTCA CTTGTCAAAC AAAAGGCTGC TTTCTCAGTT TTACCCATGG GAATTC 176

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 21

TTAGACTACC CATGGAACCC GCGCCGCGAG GGCTCCTTC 39

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 22

CAGGAGAACT TTGGTTCGAA AAAGCTTTGA CTTCTT 36

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 23

AGAGCGGCCG CAAAATGTTC GCCAACCTAA

30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 24

TTTTGTCGAC TAGACGCGTG AAGCATGCCC

30

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 25

CGCCAGGGTT TTCCCAGTCA CGAC

24

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 26

ATGGGCCGGC TCTTTTATCC AAAGATAC

28



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05474

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C12N 1/19, C12P 21/02 // (C12N 1/19, C12R 1:865), (C12P 21/02, C12R 1:865)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 1/19, C12P 21/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nakayama K. et al. "OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides" EMBO J., Vol.11 (1992) pp.2511-2519	1-30
A	Odani T. et al., "Mannosylphosphate transfer to cell wall mannan is regulated by the transcriptional level of the MNN4 gene in Saccharomyces cerevisiae" FEBS letters, Vol.420 (1997) pp.186-190	1-30
A	Nakanishi Y. et al., "Structure of the N-Linked Oligosaccharides That Show the Complete Loss of $\alpha$ -1,6-Polymannose Outer Chain from och1, och1 mnn1, and och1 mnn1 alg3 Mutants of Saccharomyces cerevisiae" J. Biol. Chem., Vol.268 (1993) pp.26338-26345	1-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 14 November, 2000 (14.11.00)		Date of mailing of the international search report 05 December, 2000 (05.12.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 1/19, C12P 21/02 // (C12N 1/19, C12R 1:865), (C12P 21/02, C12R 1:865)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 1/19, C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nakayama K. et al. "OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides" EMBO J., 第11巻 (1992) p. 2511-2519	1-30
A	Odani T. et al. "Mannosylphosphate transfer to cell wall mannan is regulated by the transcriptional level of the MNN4 gene in Saccharomyces cerevisiae" FEBS letters, 第420巻 (1997) p. 186-190	1-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 11. 00

国際調査報告の発送日

05. 12. 00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

4 B

9 0 5 0

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nakanishi Y. et al. "Structure of the N-Linked Oligosaccharides That Show the Complete Loss of $\alpha$ -1,6-Polymannose Outer Chain from och1, och1 mnn1, and och1 mnn1 alg3 Mutants of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " J. Biol. Chem., 第268巻 (1993) p. 26338-26345	1-30